

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Físico-química y Técnicas industriales



TESIS DOCTORAL

Estudios en el sistema insoluble lectina-enzimas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Pedro Andrés Carvajales

Madrid, 2015

TP
1984
147

Pedro Andrés Carvajales



X-53-224-85-X

ESTUDIOS EN EL SISTEMA INSOLUBLE LECTINA-ENZIMAS

Departamento Físico-Química y Técnicas Industriales
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
1984



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 147/84

© Pedro Andrés Carrascales
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1984
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-10189-1984

UNIVERSIDAD DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

ESTUDIOS EN EL SISTEMA INSOLUBLE LECTINA-ENZIMAS

Memoria presentada por
Pedro Andrés Carvajales
para optar al Grado de
Doctor en Farmacia

Madrid, Febrero de 1981



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE FARMACIA
CATEDRA DE TÉCNICAS INSTRUMENTALES
MADRID - 3

DON MANUEL ORTEGA MATA, CATEDRÁTICO DE TÉCNICAS
INSTRUMENTALES DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA
UNIVERSIDAD DE ALCALA DE HENARES (MADRID)

CERTIFICO: Que el presente trabajo de investiga-
ción titulado "Estudios en el sistema insoluble
lectina-enzimas" ha sido desarrollado en el la-
boratorio de Técnicas Instrumentales de la Fa-
cultad de Farmacia de la Universidad Compluten-
se de Madrid, por el Licenciado en Farmacia -
Pedro Andrés Carvajales, bajo mi dirección y -
constituye la tesis para aspirar al grado de -
Doctor.

Para que conste, firmo el presente certificado
en Madrid, a 29 de Enero de 1981.

El Director

VºBºdel Ponente

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en la Cátedra de Técnicas Instrumentales, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, durante los cursos 1.977-78, 1.978-79, 1.979-80, 1.980-81, bajo la dirección del Profesor D. Manuel Ortega Mata, a quien hago constar con todo mi agradecimiento sus constantes orientaciones, al Profesor D. Pablo Sanz Pedrero su estímulo y ayuda prestada en todo momento. También a mis compañeros y amigos su apoyo y estímulo que han sido elementos muy importantes en el desarrollo de este trabajo.

Por último, nuestro agradecimiento al Instituto Español de Hematología y Homoterapia, por las facilidades dadas en todo momento, proporcionándonos las muestras necesarias.

Madrid, Febrero de 1.981

A mis padres

INDICE

INDICE

| | <u>Pág.</u> |
|---|-------------|
| INTRODUCCION TEORICA | I |
| PARTE EXPERIMENTAL | 27 |
| Material y Métodos | 28 |
| Resultados obtenidos | 28 |
| a) Estudios realizados sobre el soporte | |
| - Unión de la lectina del extracto del Myrtus a los hematíes tratados con glutaraldehído | 29 |
| - Influencia del pH en la estabilidad del sistema de hematíe-glutaraldehído(HG) | 30 |
| - Influencia del pH en la unión de la lectina al sistema HG | 32 |
| - Influencia del pH y de la temperatura en la estabilidad del sistema hematíe- glutaraldehído-lectina (HGM) | 34 |
| b) Estudio sobre el sistema hematíes- glutaraldehído-lectina-ureasa (HGMU) | |
| - Inmovilización de la ureasa en el sistema HGM | 36 |
| - Influencia del pH en la inmovilización de la ureasa al sistema HGM | 37 |
| - Técnica de trabajo para determinación de la actividad del sistema inmovilizado | 40 |
| - Influencia del pH en la actividad de la enzima | 41 |

| | |
|---|----|
| - Influencia de la temperatura en la actividad enzimática | 43 |
| - Estabilidad del sistema HGMU durante la conservación | 45 |
| - Estabilidad de la enzima inmovilizada a la acción de sucesivos pases de sustrato ... | 50 |
| - Estabilidad de la ureasa a la acción de soluciones de distintos pH y a temperaturas diferentes | 52 |
| - Efectos inhibidores | 57 |
| - Determinación de la constante de Michaelis-Menten | 62 |
| c) Estudios realizados en el sistema hematie-glutaraldehído-lectina- α -amilasa (HGMA) | |
| - Técnica de trabajo para la determinación del sistema inmovilizado | 64 |
| - Influencia del pH en la inmovilización de la α -amilasa al sistema HGM | 66 |
| - Influencia del pH de incubación en la actividad del enzima | 68 |
| - Influencia de la temperatura en la actividad enzimática | 70 |
| - Estabilidad del sistema HGMA durante la conservación | 72 |
| - Estabilidad de la enzima inmovilizada a la acción de sucesivos pases de sustrato ... | 78 |
| - Estabilidad de la α -amilasa a la acción de soluciones de distintos pH y temperaturas diferentes | 82 |
| - Determinación de la afinidad hacia el sustrato | 86 |

| | |
|---|-----|
| - Comportamiento de los sistemas | |
| HG, HCM, HGMU y HGMA | 88 |
| d) Estudios realizados en el sistema | |
| pepsina-lectina (PM) | 98 |
| - Influencia del pH en la actividad | |
| del enzima | 99 |
| - Influencia de la temperatura | |
| en la actividad enzimática | 101 |
| - Estabilidad de la enzima inmovilizada | |
| a la acción de sucesivos pases de | |
| sustrato | 104 |
| - Estabilidad de la pepsina a la acción | |
| de soluciones de distintos pH y | |
| temperaturas diferentes | 104 |
| - Inmovilización sobre soportes | 109 |
| DISCUSION DE RESULTADOS | 110 |
| CONCLUSIONES | 123 |
| BIBLIOGRAFIA | 126 |

INTRODUCCION TEORICA

Una enzima inmovilizada podría definirse como aquella que, por un camino u otro, se encuentra constreñida dentro de los confines limitados de un soporte.

La inmovilización se ha de llevar a cabo en un soporte o matriz insoluble, en su superficie, en su interior. Cada forma de inmovilización va a tener sus ventajas y sus inconvenientes al existir una diferencia en el proceso de difusión del sustrato hacia la enzima según esté inmovilizada en el interior o en el exterior del soporte, lo que va a traducirse en una conducta cinética diferente. Las enzimas inmovilizadas pueden tener una serie de ventajas sobre las solubles, si esa variación de la conducta cinética puede ser aprovechada convenientemente.

La velocidad de reacción de una enzima inmovilizada va a depender como en las solubles de unas condiciones operacionales tales como: Temperatura, pH, composición del sustrato, presencia de inhibidores. Pero además de estos nos vamos a encontrar con otros más específicos de la inmovilización como: Tamaño del soporte, durabilidad de este último, limitaciones difusionales, etc.

La cantidad de enzima que se pueda unir al soporte va a estar influenciada por varias causas, tales como: Área aprovechable del portador, diámetro del poro y tratamiento proporcionado a la superficie antes de la inmovilización y el posible efecto estérico. La vida media de esta enzima unida al soporte, como en el caso de la soluble, va a depender primeramente, de la naturaleza de la propia enzima, de su solubilidad, de la presencia de inhibidores, de la estabilidad respecto al pH y a la temperatura y ya particularmente más dirigido a las enzimas inmovilizadas, dependerá de la naturaleza del soporte, de su durabilidad y estabilidad a las condiciones de incubación y almacenamiento.

Respecto a los factores que podrían influir sobre la actividad de la enzima inmovilizada podríamos citar a la presión que el sustrato ejerce al pasar por la columna, está a su vez afectado por la viscosidad, velocidad, temperatura, tamaño, forma de la partícula y empaquetamiento de la columna.

Las enzimas inmovilizadas van a tener una serie de ventajas sobre las solubles, entre las que podríamos destacar una capacidad de uso mayor, ya que bastará con retirar la enzima inmovilizada al finalizar el proceso de catalisis y recoger el producto de la reacción con alto grado de pureza libre de enzima, lo que no ocurriría si el proceso se hubiese verificado con la enzima en solución. Al poder usar la enzima inmovilizada repetidas veces se abarataría el coste de utilización de las enzimas para diversos procesos en que es necesaria su presencia. El proceso de inmovilización puede dar lugar a estabilizar a las enzimas hacia factores externos tales como pH, temperatura, almacenamiento y presencia de sustrato y a la preparación de sistemas multienzimáticos.

La mayor parte de las enzimas inmovilizadas exhiben una conducta cinética alterada respecto a la que pudiera tener las enzimas solubles (1). Normalmente las actividades decrecen. Esto puede deberse a varias causas, una de ellas sería el cambio conformacional de la estructura de la enzima durante el proceso de inmovilización, otra porque tiene diferente entorno después de la inmovilización y otra por defectos difusionales debido a que el sustrato debe de difundir primeramente sobre la superficie del soporte o en su interior y después ser captados por la enzima.

Una consideración en el uso de la enzima inmovilizada es la capacidad de retención en condiciones de almacenamiento y uso. Si

la velocidad de la reacción está limitada por efectos difusionales, hay un aparente incremento del período de vida media de la enzima inmovilizada (2). Este incremento en la estabilidad puede encontrarse en concentraciones bajas de sustrato en actividades enzimáticas altas, cuando las dimensiones del soporte sean grandes.

Puede haber un cambio de actividad de las enzimas inmovilizadas con respecto de las solubles, habiéndose encontrado casos en que la K_m aparente es más alta, respecto a la enzima soluble, en la glucoamilasa inmovilizada en carbón activo (3); más baja en aminocilasa inmovilizada en DEAE celulosa ó en DEAE Sephadex, y sin variación en la fosfatasa ácida y fosfoglucomutasa inmovilizada en silicagel (4).

A veces se ha producido por parte de la enzima inmovilizada un cambio en la especificidad del sustrato relativo a la enzima soluble (5). Respecto de la acción de los inhibidores también han mostrado cambios sustanciales en la acción sobre las enzimas, bien incrementando esa inhibición como en la glucoamilasa (6) (7) por parte del acetato de mercurio, ó presentando una mayor resistencia como en la fructofuranosidasa hacia el acetato de mercurio. Con otro agente desnaturalizante como la urea puede haber por el contrario una activación de la enzima inmovilizada que podría ser debido a que la urea convertiría la estructura rígida del complejo en otra más elástica y por eso se producía la activación, este caso se da con la aminociclasa en DEAE Sephadex ó DEAE celulosa (8) (9).

Pero el empleo de las enzimas también va a presentar una serie de desventajas entre otras debemos de significar: a) Su coste, la inmovilización, a parte del costo del proceso enzimático en sí, va a crear otros, debido al soporte, al ligando, al propio proceso de inmovilización y al proceso de utilización de la enzima que al ser más complejo es más caro. b) La pérdida de actividad por parte de la enzima inmovilizada es otro de los problemas muy a tener en cuenta, ya que la pérdida de la actividad puede ser muy elevada. c) Como ya hemos dicho anteriormente los procesos enzimáticos que se realizan con las enzimas inmovilizadas son mucho más complejos por necesitarse otra tecnología, y en muchos casos con gran especificidad para cada uno. d) Se pueden producir problemas al ser el soporte tóxico, por ejemplo, los geles de acrilamida, normalmente este soporte no es usado en procesos de transformación para los alimentos y e) Sólo se puede aplicar cuando los sustratos están en solución.

Soportes empleados para la inmovilización de las enzimas.

Estos soportes se van a utilizar para unir primero el ligando y después la enzima correspondiente. Los soportes que se han empleado normalmente para la inmovilización han sido de la siguiente naturaleza: a) Polisacáridos, b) Soportes inorgánicos, c) Proteínas fibrosas, d) Polímeros sintéticos, e) Hidrogeles, f) Fibras huecas, g) Células de la sangre. Algunos de estos soportes pueden usarse para constreñir la enzima dentro de ellos.

a) Polisacáridos. Muy utilizados, actúan principalmente por adsorción, como ejemplos podemos citar la producción de la L amino ácidos en Japón utilizando como soporte para las enzimas proteolíticas el DEAE Sephadex (10, 11). La celulosa es otro soporte muy empleado, como lo es también la celulosa en la que han sido sustituidos

ciertos grupos hidroxílicos por grupos dietil aminados (DEAE), por grupos carboximetílicos que van a producir un cambio ácido débil mientras que en el primero el cambio que se va a producir va a ser básico débil. El DEAE celulosa se ha empleado para la glucosa isomerasa (12, 13, 14).

Otro polisacárido muy usado por tener una estabilidad bastante grande a los cambios de pH y resistente a la contaminación microbiana va a ser la quitina. Se ha empleado para unir glucosa isomerasa (15), glucoamilasa (16) por simple adsorción, requiriendo un tratamiento previo para eliminar el carbonato cálcico que le acompaña. Se ha modificado el soporte mediante su reacción con el glutaraldehído y sobre él se han inmovilizado lactasa, fosfatasa ácida, quimiotripsina (17), glucoamilasa (18).

b) Soportes inorgánicos. Son muy empleados ya que tiene unas características muy favorables entre las que se pueden citar: a) Estabilidad estructural a diversos pH, presiones y temperaturas, b) Óptimas cualidades para los reactores de flujo c) Inerte ante los ataques de microorganismos ó de enzimas d) Fácil adaptabilidad a tamaños y forma de las partículas, e) Gran capacidad de regeneración.

Las formas de inmovilización de las enzimas al soporte pueden hacerse mediante adsorción ó por enlace covalente. El primero en utilizar esta clase de soportes fué Weetall (19, 20). El vidrio poroso ó el modificado han sido unos soportes muy utilizados en la inmovilización de las enzimas (18, 20, 21, 22). El vidrio se puede activar mediante el alquil amino silano y mediante las uniones carbómidas; la tiourea, azo y reactivos polimerizantes como glutaraldehído y polietilenimina se pueden unir las macromoléculas, pero

este sistema tiene un inconveniente y es que se puede destruir a un pH 7, aunque para paliarlo se recubre con óxido de zirconio. Útiles son también el titanio, óxido de titanio activado con 5 amino salicílico, ácido tánico (23).

Otro soporte empleado ha sido arena porosa pudiendo inmovilizar por ejemplo ureasa, alcohol deshidrogenasa (24), β -galactosidasa (25) pudiéndolo recubrir para la protección por el mismo método anterior. Mallas de níquel se ha utilizado para inmovilizar mediante enlace covalente la glucosa oxidasa (26). El óxido de níquel recubierto de sílice ó glutaraldehído han sido utilizados para la inmovilización (26) (27, 28). La cerámica porosa, alúmina de poro controlado se ha utilizado como soporte para la glucosa isomerasa (29, 30).

c) Proteínas fibrosas.

Por la forma estructural que tienen de microfibrillas y las cavidades que disponen, las hacen bastante ventajosas para la inmovilización de las enzimas. Otras ventajas son la poca resistencia a la difusión del sustrato y por su estructura interna, una potencial capacidad de inmovilización muy grande, además de una marcada estabilidad.

Uno de los soportes utilizados es el colágeno (31) que une a las enzimas mediante una formación de mallas con uniones no covalentes y también con posibles uniones aniónicas mediante las fuerzas de Van der Waals (32, 33).

e) Resinas fenólicas.

Una resina producida mediante la reacción del fenol y del formaldehído (ES 762) ha sido empleada con muy buenos resultados como

soporte de diversos enzimas (34, 35, 36, 37).

Como hemos visto en otros casos la adición de glutaraldehído va a producir una mayor retención de la actividad enzimática, además la retención es rápida a temperatura ambiente. Una de las ventajas es que la enzima puede ser removida por el tratamiento de la resina por una solución ácida ó básica y así de esta manera poder adsorberse una nueva enzima al soporte. Esta resina ha sido utilizada para inmovilizar amilasa (34), lactasa (34, 35), tripsina, glucuronidasa y otras enzimas. Resinas de intercambio aniónico han sido utilizadas como soporte para la inmovilización de invertasa (35), glucosa isomerasa y aspartasa (35). Tales complejos con invertasa y lactasa son enzimáticamente activos, si es activado con glutaraldehído.

e) Hidrogeles

El método de entrapamiento por un gel es otro de los métodos más utilizado hoy en día. La inmovilización se realiza mediante una reacción de entrecruzamiento clásica estando la enzima en el interior de la red formada. Una de las redes más usadas es la resultante de la polimerización de la N-N-Metilen acril-amida. La inmovilización mediante entrapamiento está revisándose continuamente, más concretamente la inmovilización con acrilamida ha sido y es muy utilizada. En estos soportes hay que tener en cuenta la fuerza mecánica y el tamaño de la red resultante para que pueda pasar las moléculas del sustrato. Otros geles que se han probado son los formados con el 2 hidroxí etil metil acrilato (39) ó con monómeros y polímeros como la N vinil piroolidona. Otro ejemplo clásico de gel es el gel de almidón. El primer enzima que se inmovilizó en este gel fué

la colinesterasa (40) (41) Bernfeld y Wan fueron los primeros en usar los geles de poliacrilamida utilizando para inmovilizar glucosa oxidasa, catalasa, lacticodeshidrogenasa entre otras enzimas. Mediante este sistema, acoplando reacciones tanto de enzimas inmovilizadas como de sustratos inmovilizados, tienen una aplicación muy grande en clínica para las determinaciones de parámetros bioquímicos.(42)

f) Fibras sintéticas.

Estos soportes nos ofrecen muchas ventajas como sistema para inmovilizar enzimas con una gran aplicación en la industria del alimento. Hay dos tipos de mecanismos, uno con fibras isotrópicas que son normalmente fibras de celulosa y otras anisótropas que no son fibras celulósicas. Las isotrópicas son homogéneas y permiten el fácil paso de un soluto o de un solvente de un extremo a otro de la fibra. Entre las anisótropas, que no están hechas de celulosa, pueden estar formadas de cloruro de vinilo y poliacrilnitrilo. En las fibras isotrópicas la inmovilización va a consistir en un constreñimiento de una enzima en solución entre la región porosa de las fobras. En estos sistemas se han hecho cálculos matemáticos para la producción de modelos teóricos, desarrolladas por Waterland. (43)

Con estos sistemas se han inmovilizado glucosa isomerasa (44) galactosidasa, invertasa (45). El problema es que la vida media de la enzima inmovilizada es igual a la de la soluble.

Otra fibra muy usada es la del Nylon tratándole con Me SO_4 y activándolo con un radical como pudiera ser poli (amino ácido) ó poliamina; de esta manera se han logrado inmovilizar enzimas como la lactato dehydrogenasa (46). Otra de las fibras que están usándose mucho es el téflón (47).

g) Células de la sangre como soporte

Una de las células más empleadas ha sido el hematíe bajo dos formas diferentes; una de ellas es como transportador de la enzima en el interior del mismo y la otra como transportador de la enzima en su superficie externa. El hematíe puede ser un buen transportador de una enzima determinada para realizar una terapia por reemplazamiento. El hematíe puede llevar a los lisosomas las enzimas y allí producir un almacenamiento lisosomal ó también podría utilizarse para que la enzima vaya actuando cuando está en circulación por el organismo. Normalmente los hematíes que han sido utilizados como vehículo han sido vaciados de su contenido interior (48). Esto fué a raíz de unas observaciones que se hicieron al comprobar que sustancias de gran peso molecular podían pasar por los poros como es el caso de la ferritina, hemoglobina, dextranos (49) (50) (51) (52), etc., y entonces supusieron que a su vez también podrían entrar moléculas grandes como las enzimas. En cuanto al sustrato, se ha visto que el hematíe es muy impermeable a muchas sustancias excepto a unas pocas como las purinas, ácido úrico, glucosa, aminoácidos; se ha comprobado que para poder entrar van a necesitar de la presencia de un portador proteínico para facilitar la difusión. Una desventaja entonces que podría tener este sistema es la poca accesibilidad del sustrato hasta el enzima.

Para la utilización del hematíe como portador de enzimas en su membrana se han utilizado esta célula pero después de haber sido sometida a tratamientos con reactivos mercuriales, sulfidrilos y glutaraldehído. Recientemente está referido en la literatura la utilización de hematíes tratados con reactivos mercuriales y sulfidrilos para la inmovilización de α amilasa con fines médicos (53). Un problema que se plantea en el uso de este soporte para fines médicos

en el organismo es conocer su proceso de eliminación. Se ha comprobado que los hematíes sometidos a la acción de reactivos mercuriales y sulfidrílicos han mostrado una preferencia en los dos casos hacia el bazo e hígado (54) según condiciones. El hematíe tratado con el glutaraldehído parece tener una gran exclusividad por el hígado, aunque esto puede ser debido a un mayor flujo por parte de la sangre hacia este órgano, esto hace pensar en el uso de estos transportadores para la terapia bien en el hígado o en el bazo; en el caso concreto de los hepatomas, por estar muy irrigados, tienen una facilidad de que le llegue el portador con su enzima (55). Los hepatomas fagocitarían al hematíe con la enzima inmovilizada. Esta enzima pudiera ser una proteolítica, neuroamidinasa, glucocerebrosidasa como terapia para la enfermedad de Gauchers (56), (57).

La otra célula que ha sido empleada como posible portador de enzimas es el trombocito, consiguiéndose la inmovilización de diversas enzimas como son la glucosa isomerasa, peroxidasa, arginasa. Estas células parecen tener una mayor capacidad de inmovilización que los hematíes (58).

Características del soporte ideal.

El soporte insoluble debería tener una constitución porosa para permitir una entrada y salida homogénea de las macromoléculas. El grado de porosidad es muy importante para un flujo eficaz y además para impedir una acumulación de las macromoléculas dentro de la matriz.

Las partículas del soporte deberían de ser rígidas y de forma esférica, ya que las partículas, al ser sustancias de baja velocidad de difusión, el equilibrio se logra mucho más fácilmente con partículas apropiadas. Estas deberían de ser uniformes y esféricas ya que si no el equilibrio de difusión se retardaría y se atenuaría. Habría una menor resistencia al flujo cuando las partículas

del lecho fueran de forma alargada y tendrían que poseer una rigidez adecuada para evitar deformaciones debidas a la presión hidrostática requerida para generar un flujo de líquido capaz de atravesar el lecho.

No deberían de tener interacciones químicas con las sustancias que se van a unir pudiendo así minimizar la adsorción no específica. Un contenido bajo de grupos iónicos es esencial para evitar los efectos de cambio iónico, particularmente cuando la cromatografía está preformada con un bajo contenido de fuerza iónica. Así mismo, deberían tener una estabilidad tanto mecánica como química; la resistencia mecánica es muy importante para las condiciones del acoplamiento con el ligando seleccionado y su posterior unión con la macromolécula correspondiente. Una gran estabilidad respecto a los cambios de pH y temperatura y a ser posible el evitar crecimiento de microorganismos son también modificaciones muy importantes.

Y por último para poder realizar una cromatografía de afinidad deberán poseer grupos funcionales que puedan ser activados ó modificados. Las formas y composiciones más convenientes de los soportes insolubles han sido modificados a conveniencia por un gran número de autores (59, 60, 61) .

Problemas asociados con el soporte.

a) Macroambiente ó efectos de exclusión del soporte.

Cuando un ligando específico es inmovilizado en un soporte, la porosidad del lecho, como hemos visto anteriormente, puede determinar la accesibilidad del ligando hacia las interacciones con sus proteínas complementaria. Este es el efecto de exclusión del soporte que

gobierna la concentración de ligando efectivo. Por ejemplo, la concentración del ligando libre aprovechable a unir a la macromolécula y de este modo determinar la conducta del sistema bajo las condiciones operacionales. Así de esta manera la inmovilización del ligando específico en un soporte de baja porosidad puede impedir la accesibilidad del ligando que une y de esta forma la efectividad del adsorbente resultante también baja.

b) Microambiente ó efectos estéricos.

Independientemente de la porosidad del material del soporte el ligando afín es acoplado al soporte rígido, la interacción con la proteína complementaria en este caso la enzima al colocar podría estar estéricamente obstaculizada al estar el ligando colocado en el extremo de una larga cadena.(12, 13).

c) Tamaño de las moléculas.

La importancia de interponer una cadena carbonada entre el ligando y la matriz está muy justificado ya que se ha comprobado la ineficacia de adsorbente comprimido, por ejemplo, el D metil éster triptófano unido directamente a la agarosa, tiene una menor eficacia al intentar purificar la α quimotripsina (12), que el mismo ligando unido a una cadena hexameten. Ahora debemos hacer dos consideraciones respecto a esa cadena ó brazo separador; una es la longitud en la cual se muestra una máxima eficacia por parte del adsorbente y la otra es si por su naturaleza pudiera interaccionar con el ligando produciendo efectos no deseables.

d) Longitud del brazo separador.

Se ha aceptado que un puente conteniendo un mínimo de 4 a 6 (13) grupos metilenos deben de ser interpuestos entre el ligando y el soporte para producir una interacción óptima con la enzima; sin embargo, Cuatrecasas considera que se obtienen mejores resultados cuando se sitúa entre 2 y 12 (14) ó entre 2 y 8 según Lowe (15). Diversos autores han comprobado un pequeño incremento en la fuerza de interacción al aumentar la longitud del brazo separador.

e) Naturaleza del espaciador.

Anteriormente el componente más empleado como hemos visto era una cadena metilénica con terminales provistos de puntos de unión al soporte y al ligando con el espaciador además de provocar efectos estéricos se acentúa la posible adsorción no específica (16). Las posibles interacciones pueden contribuir a la tensión de la unión entre un ligando inmovilizado y la macromolécula complementaria de esta forma suplementar a las que están envueltas en el reconocimiento del ligando. Este "compuesto" de afinidad puede ir en detrimento de la eficacia de un adsorbente bioespecífico. Para evitar estos problemas se han ideado cadenas más hidrofílicas (17) interponiendo grupos polares tales como un grupo amino secundario, hidrofílico, péptidico a la largo de la cadena para romper los enclaves hidrofóbicos. En algunos casos, un cuidadoso control y de los efectos específicos y no específicos puede ofrecer considerables ventajas en la erradicación de efectos no específicos.

Los sesquipéptidos de glicina también han sido interpuestos entre el ligando y el soporte (18) aunque los resultados no han sido

muy esperanzadores; se han utilizado grupos como la N - glicil - glicina ó N(N glicil - glicil) glicina en unión amídica a la glucosamina y a su vez a la Sepharose 4 B, pero también ha resultado ineficaz al intentar inmovilizar a la glucokinasa hepática, mientras que igual derivado acoplado a la 6 amino hexanoato resultó eficaz para inmovilizar las enzimas (66).

e) Problemas asociados con el brazo separador.

Aparte de los problemas que están producidos por la longitud de la cadena puente y por su naturaleza, tenemos que tener en cuenta la naturaleza del ligando. Se ha sugerido que al ser grande, la longitud efectiva del separador pueden unirse ligandos hidrofóbicos a los mismos y dar unos malos resultados (67). De acuerdo con esto, es preferible que la cadena puente sea hidrofílica, además la longitud óptima conveniente podría variar según el ligando ó según la enzima a la que se va a unir como por ejemplo, para un lactato deshidrogenasa, la longitud del brazo es de 0'8 nm. análogo a un piruvato. Al aumentar la cadena puente puede ocurrir que haya un aumento de la adsorción no específica ó un decrecimiento de la efectividad de la columna. El uso de cadena puente hidrofílicas está mereciendo la atención de los investigadores.

Selección del ligando.

Además del soporte de la enzima, el ligando va a ocupar un puesto de gran importancia ya que primero va a unirse con el soporte y segundo se va a unir a la enzima correspondiente, dando todo ello un conjunto, el que la fijación de la enzima al soporte sea más ó menos eficaz, el que haya una mayor ó menor pérdida de actividad enzimática va a depender en gran manera del ligando.

Es muy importante conocer la naturaleza de las interacciones entre el ligando y las macromoléculas a las que se va a unir, para ello debemos tener en cuenta el sustrato, las condiciones de pH, temperatura, producto de la reacción enzimática. En la misma literatura nos vienen muchos ejemplos en los que el conocimiento de las interacciones nos va a permitir una mejor inmovilización.

Cuando hay reacciones bi o multifuncionales la búsqueda de los ligandos es mucho más compleja.

Afinidad de la macromolécula para el ligando.

La afinidad del ligando para la macromolécula complementaria es una de las premisas que debemos de tener en cuenta ya que de ella, principalmente, va a depender el que haya una buena inmovilización. Se han desarrollado modelos matemáticos que nos puede definir la afinidad en pocos términos y midiendo unos pocos parámetros (81).

Ecuaciones similares han sido desarrolladas por O'Carra y Nishikawa. Con ello se permite un cálculo aproximado del máximo K entre un ligando inmovilizado y una enzima (86) (89).

Del modo de unión que tenga el ligando tanto a la enzima como al soporte, va a depender su especificidad, su eficacia y posiblemente su mayor o menor actividad. Así una unión covalente del ligando al soporte a través de grupos funcionales puede ser un adsorbente efectivo, mientras que la unión a otro punto puede ser parcialmente efectivo e incluso ineficaz.

La concentración del ligando es importante pues ocurre a veces que es diferente la concentración eficaz de la real. La concentración de enzima unida está determinada por la siguiente ecuación:

$$\frac{(EL)}{(E)} = \frac{(L)}{K_L} \left(1 + \frac{(L)}{K_L} \right)$$

K_L - constante de disociación
 L - concentración del ligando
 E - concentración de la enzima
 EL - enzima inmovilizada

Si la concentración de la enzima se incrementa, la capacidad de adsorbente viene determinada por la concentración del ligando inmovilizado (88). Realmente la capacidad de afinidad de los adsorbentes es inferior a la esperada, como ya hemos dicho anteriormente, ya que en algunas puede ser aproximadamente un 1% de la calculada (88) (88), (78). Una menor concentración del ligando permitiría una mejor elución sin necesidad de utilizar medios que podrían ser drásticos y poder producir desnaturalizaciones; una mayor concentración podría originar aberraciones cromatográficas. Es muy importante que al hacer la inmovilización de una enzima se conserve lo más intacta posible la estructura terciaria.

El ligando podría modificarse químicamente sin que haya por eso un detrimento en la interacción con la enzima complementaria, sino que además podría reforzarse la interacción y poder producir una mejor y más efectiva inmovilización.

Técnicas de unión de la enzima a los distintos soportes.

Las técnicas empleadas son muy parecidas, por no decir iguales, a las técnicas empleadas en cromatografía; según los procedimientos a emplear las podemos dividir en a) Adsorción hidrofóbica, b) adsorción por transferencia de carga, c) por unión covalente al soporte, d) por afinidad a los quelatos y e) finalmente por bioafinidad. Esta última técnica, es la que se va a emplear en este trabajo, por ello nos vamos a extender más en la misma.

a) Adsorción por afinidad hidrofóbica.

Un soporte típico de esta adsorción es la del carbón activo, aunque este está ya en desuso al encontrarse otros más adecuados para la inmovilización. Un ejemplo de estos es la agarosa, este adsorbente empleado para la inmovilización se introdujo con gran éxito. (71, 72, 73, 74, 75), El primer anfipático se realizó mediante el acoplamiento de aminas soporte de gel previamente activado por bromuro de cainogeno. Posteriormente se introdujeron grupos ionogenicos y de esta forma también podía funcionar como cambiador de iones (73) Porath y Laas (76) sintetizaron geles que contenían grupos bencil éter; más tarde se sintetizaron geles con grupos alquilo y acilos. La importancia de estos geles se debe a que con el hinchamiento, al tener que pasar el solvente de la solución, pueden ser permeables a solutos de elevado peso molecular. Estos geles se mejoraron con la adición de cadenas más cortas.

En las pruebas que se hicieron con proteínas y otras sustancias, se presentaron una ventajas bastante grandes de este procedimiento sobre otros de unión covalente, una de las principales era la reversibilidad del soporte permitiendo el uso del mismo para sucesivas

inmovilizaciones de proteínas ó enzimas según pudo comprobar Chibata.

Otra de las variaciones del soporte es con el acoplamiento con epíclorhidrina mediante una reacción de entrecruzamiento con la agarosa en fuerte alcalinidad y calentando en presencia de bromuro de alquilo (77, 78). Con este sistema se inmovilizaron muchas enzimas teniendo para cada una de ellas un poder distinto de adsorción, así por ejemplo, con la β amilasa era con la que tenía menor poder adsorbente mientras que, por ejemplo, la amilglucosidasa la adsorbía muy fuertemente.

b) Cromatografía por quimoadsorción covalente.

Los geles de agarosa activados tienen la facultad de unir proteínas y otras muchas sustancias covalentemente al soporte indicado. Esta quimoadsorción puede ser reversible ó irreversible, un ejemplo de quimoadsorción irreversible es el acoplamiento de un aminoácido, péptido ó proteína mediante el oxirane. Un método reversible es la inmovilización de proteínas basado en el cambio tiol-disulfuro fué ideado por Brocklehurst y desarrollado por Carlsson y colaboradores (79, 80, 81, 82, 83). El gel que contiene tiol es formado a partir del bisoxirano en agarosa y activado por el 2-piridil disulfuro, y ya activado se le añade la proteína conjugada que muy bien podría ser una enzima para su inmovilización. Este proceso como hemos visto anteriormente es irreversible, pero podría hacerse reversible por reducción de la unión, por ejemplo, a tiol con un reactivo tal como el dithiothreitol y volverse a formar el primer gel ya regenerado proceso que se puede hacer indefinidamente.

Para inmovilizar papaina y ureasa se ha empleado el cambio tiol disulfuro, se puede hacer el proceso mediante dos vías 1) por limitación selectiva de la unión disulfuro y así de esta manera la acti-

vidad biológica queda retenida 2) Por tiolización de los grupos amino de la enzima (80).

c) Afinidad mediante formación de quelatos

Porath y colaboradores (81) desarrollaron una línea de investigación para la posible inmovilización de aminoácidos, péptidos y proteínas mediante quelatos que estaban inmovilizados en agarosa. Observaron que los quelatos formados por bicarboximetil amino y agarosa, activada mediante una cadena de longitud adecuada y un metal que podía ser en estos casos Zn y Cu, presentaba una cierta afinidad sobre las moléculas anteriormente expuestas. No obstante advirtieron que cuando se hacía en presencia de altas concentraciones de sales, la afinidad crecía ya que se apreciaba que las posibles formas de adsorciones iónicas no específicas desaparecían. En ausencia de estas concentraciones la afinidad bajaba ostensiblemente.

d) Adsorción por transferencia de carga.

Al disponer de ligandos ricos en electrones deslocalizados y poderlos unir a un soporte de gel, les confiere a este gel el poder interactuar con una gran variedad de sustancias.

Algunos derivados del gel de agarosa tales como riboflavina y dinitrofenil agarosa pueden formar complejos de transferencia de carga, por ejemplo, la riboflavina forma complejos con la serotonina, N-acetil triptófano con el triptófano (84) (85).

e) Mediante bioafinidad.

Si a un soporte de agarosa desionizada, que como hemos visto anteriormente es un buen sistema para producir una reacción de en-

treecruzamiento le unimos como ligando una lectina, se crearía una matriz con posible aplicación para cromatografía de bioafinidad.

Es un hecho comprobado el que las lectinas tienen una distinta afinidad para distintas sustancias como los carbohidratos, glicoproteínas y glicolípidos. El primer paso va a consistir en la purificación de la lectina, para ello se va a necesitar un adsorbente lo más específico posible para esa lectina. A veces un gel de polisacáridos puede adsorber específicamente alguna lectina como por ejemplo la Concavalina A que es adsorbida específicamente por el Sephadex (88) así como en el caso de la lectina proveniente de la Vicia Craca (87). Si al Sephadex se le somete a reacciones como la unión de los carbohidratos con divinil sulfona y después se elimina el exceso de grupos vinílicos mediante el mercaptoetanol (88) (89). El mecanismo por el cual se produce este proceso no se sabe con certeza ya que aún no se conoce que grupo hidróxido está involucrado, de esta manera, la manosa y agarosa así obtenidos van a tener una gran capacidad para unir las lectinas muy específicamente. De esta forma se unieron lectinas de la Vicia sativa a Manosa - Sepharose 6B siendo desplazada con dimetil D manósido (89). De la semilla de la Crotolaria juncea fué aislada mediante el proceso anterior utilizando ECD Sepharose 6B parcialmente hidrolizado (90) y galactosa Sepharosa 4B (91). La capacidad de adsorbente se iba incrementando en este orden. Los geles con lectina por ejemplo, los de agarosa unidos a las lectinas presentan unas grandes perspectivas para el fraccionamiento de diversas sustancias como las glicoproteínas (90) (92).

La Concavalina A - Sepharose interacciona con enzimas que tienen estructura gluco-proteica por ejemplo con hidrolasa lisosomales (93) fosfatasa alcalina (94) y fosfatasa ácida humanas, con el ci-

pacron blue F 36 A para el aislamiento de deshidrogenasas.

La lectina que se va a utilizar en este trabajo es la que está presente en los extractos de las semillas de *Myrtus communis* (L). Esta lectina viene estudiándose desde hace años en el Gabinete de Técnicas Instrumentales de la Facultad de Farmacia. Esta lectina fué inicialmente reseñada por Ortega y Dolara (18) viéndose que no es específica de grupos sanguíneos. La composición elemental del extracto bruto arrojó los siguientes resultados $N = 0,83\%$, $C = 42,82\%$, $H = 4,38\%$. Estos resultados contrastan con el resto de las lectinas ya que tienen mayor proporción de nitrógeno, por lo que parece más indicado que esta lectina tenga una estructura más de oligopéptido que de proteína. Además se diferencia de otras lectinas en que no tiene carácter estimulante para los linfoblastos, aunque se observa un hecho muy curioso y es que cuando se aumenta la concentración de extracto, hay una menor capacidad de transformación (19)

Estudios más recientes sobre esta lectina (20), estudiándola mediante la técnica de capas monomoleculares, permiten deducir, que la lectina es de pequeño tamaño anfifílica y con posibilidad de tener en su parte polar un grupo ionizable

La lectina del *Myrtus* interacciona con componentes del suero (21) humano tanto, con los componentes proteicos como lipídicos, y es más, tiene mucha más actividad sobre estos últimos. Las fracciones proteicas sobre las que actúa con principalmente sobre glico-proteínas y lipoproteínas y algunas globulinas. Las fracciones del suero que son las primeras en interaccionar, son las α_1 y α_2 , con mayores concentraciones de extracto, las γ y las β y α hasta su casi total precipitación mientras que la interacción sobre la albúmina sólo se puede demostrar por el cambio en la velocidad de migración (22)

electroforética. Se siguió trabajando sobre las γ globulinas viéndose una interacción relativamente intensa con las Ig M, observándose una selectividad sobre las cadenas pesadas y no una afinidad muy manifiesta sobre las Kappa y las lambda. (100)

Ya hemos indicado la interacción de la lectina sobre los componentes lipídicos del suero humano (triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y lipoproteínas). En cuanto a la acción sobre lipoproteínas se ha observado una precipitación total de los quilomicrones, lipoproteínas, y a mayor concentración de extracto las α y las pre- α . En todos los casos se ha observado una mayor actividad de la lectina a un pH de ácido débil mientras que a partir de pH 7 ó eminentemente ácido la actividad bajaba. Por todo lo anteriormente indicado no se demuestra que haya una correlación entre el peso molecular de la molécula, ó su contenido en carbohidratos y su posible precipitación.

Se estudió la posibilidad de incorporar la lectina del Myrtus a geles de suero para la preparación de inmuno adsorbentes y su posible aplicación para técnicas de cromatografía de afinidad (101).

La unión de la lectina estudiada a los hematíes, previamente fijados con glutaraldehído, va a modificar la membrana del hematíe y aún conservada su capacidad, aunque algo disminuida, de interaccionar con proteínas, lipoproteínas. Esta capacidad ha sido usada como método de clarificación de sueros lipémicos y de esta manera eliminar la interferencia debida a la turbidez en determinaciones mediante espectrofotometría (102).

Otro dato de interés de esta lectina es su acción sobre un tumor experimental tipo Yoshida. Fué estudiado por Ortega y Otero (103). Observando una disminución de crecimiento, según dosis y vía de administración.

Como ejemplo de las aplicaciones que se han realizado con las enzimas que nos ocupan este trabajo, es decir la ureasa y la amilasa, tenemos las siguientes: Chang (104) (105) (106) (107) propuso como técnica de inmovilización de la ureasa la microencapsulación, observándose un descenso de la actividad enzimática de alrededor de un 63%, esta enzima posteriormente fué estabilizada mediante la hemoglobina, perdiéndose menos actividad. El problema que antes indicamos como era la imposibilidad del paso del sustrato, se palió dado el peso molecular de la urea y su tamaño capaz de pasar por los poros de la membrana del hematíe y además su gran difusibilidad. La ureasa inmovilizada por microencapsulación fué estudiada para ver sus posibles aplicaciones en los seres vivos. Con una inyección intrape^{ri}toneal de ureasa microencapsulada (100 Summer en 0'25 ml/Kg) se observó una subida en el nivel de amoníaco en sangre, apreciándose la posibilidad de aplicación del sistema a organismos vivos, viendo la viabilidad de éste si se coloca al lado de la ureasa un adsorbente de amoníaco que se microniza junto con la ureasa. Al inyectar 50 U Summer en 0'5 ml/Kg, el nivel de amoníaco subió a las pocas horas de la inyección. El nivel permanecía bastante alto durante las veinticuatro horas y bajaba lentamente, de manera que a los cinco días daba un nivel más alto de lo normal. El período de vida media del inmovilizado fué de 7 días a 37°C.

Otra forma de aplicación por vía parenteral del microencapsulado y en evitación de acúmulo de material externo, fué el intento por otro método mediante perfusión extracorpórea (108) (109). Para impedir la posible coagulación por el contacto de la sangre con los microencapsulados se trataron con heparina, no mostrando interferencia por parte de esta con la enzima y permitiendo hacer su acción normalmente.

Otra vía de administración para la ureasa microencapsulada fué

la administración dentro del intestino (109) (110) (111) (112) junto con un adsorbente de amoníaco, observándose que el nivel de urea en la sangre decrecía respecto a un control. La pérdida de urea se calculó de alrededor de un 60%. Se hizo una mezcla del microencapsu lado con la comida y se dió de comer a perros y se observaba también una bajada de urea en sangre (113).

Se ensayó como componente de diálisis de los riñones artificia les acompañado de un adsorbente del amoníaco, apreciándose que había una gran ventaja sobre las membranas convencionales, ya que el micro encapsulado tenía una mayor superficie y era más fácil la elimina ción de la urea (114).

Tienen otras aplicaciones como componentes de medidores poten ciométricos de iones. Así, inmovilizados de ureasa son componentes principales en electrodos para la determinación de urea (115); otra posibilidad, está en aprovechar el carácter inhibidor de algunos io nes en su reacción enzimática por lo que relacionando esa inhibición con la concentración del ion, se ha podido construir electrodos que son sensibles a iones como Ag, Cd, Co, Cu, Hg, Pb y Zn (116). En es tos casos la enzima estaría inmovilizada en geles como el de poli- acrilamida, el electrodo estaría formado por un ánodo de plata y un cátodo de platino, la separación del gel con el interior del electro do sería mediante una membrana de plástico permeable.

Como componente de termistores también ha sido desarrollado el sistema de inmovilización de ureasa; el termistor está inmerso está inmerso en una columna de ureasa inmovilizada en lechos de geles y hay una relación entre la señal y la concentración de amoníaco (117) (118) (119).

Las aplicaciones de la α amilasa la podemos concretar en la industria de la alimentación para transformar el almidón en glucosa, dado el carácter "blando" la α amilasa va a ser una pieza muy importante en el proceso ya que al ir cortando las grandes cadenas y dar oligosacáridos para que la glucoamilasa y posteriormente la glucosa isomerasa de lugar a la fructosa. El modo de inmovilización de la α amilasa puede hacerse por varios métodos unos de ellos ya usados han sido: entrapamiento en geles (41), unión a geles de poliacrilamida (120), membranas de colágeno (121) y la utilización en un reactor de flujo continuo de partículas de poliestireno (122).

PARTE EXPERIMENTAL

Como soporte para la inmovilización de las enzimas hemos utilizado hematíes humanos del grupo 0, que han sido tratados con una solución de glutaraldehído. Estos hematíes tienen unas características muy interesantes como es la de su fácil conservación, y la de ser capaces de soportar choques osmóticos muy extremos; por otra parte, dada la dificultad de aislar la lectina presente en el extracto bruto del Myrtus, se intenta, gracias a la gran avidez de esta por los hematíes, una primera purificación.

Las enzimas que se inmovilizaron sobre el sistema HCM fueron la ureasa y la α -amilasa. La primera era ureasa comercial hidrosoluble liofilizada suministrada por la marca Merck. La segunda α -amilasa provenía del *Aspergillus Oryzae*.

La urea empleada como sustrato de la ureasa, era urea suministrada por la marca Merck.

El almidón empleado como sustrato de la α -amilasa, era almidón de la clase litner suministrado por la marca Merck.

Los hematíes empleados como soporte procedían del I.E.H.H. eran de donantes sanos y eran del grupo 0.

Las semillas de *Myrtus Communis* procedían de la provincia de Badajoz.

Los métodos empleados en esta memoria están reseñados en cada apartado, pero en líneas generales han sido los siguientes:

Liofilización, este proceso se llevó a cabo en un liofilizador Leybol-Heraeus GT-2.

Espectrofotometría ultravioleta, se utiliza un espectrofotómetro Perkin Elmer 402.

Espectrofotometría visible, para su medida se utilizó un espectrofotómetro Bausch Lomb, modelo Spectronic 70.

Microscopía. En un Fotomicroscopio Zeiss modelo II automático

Preparación de los hematíes

Los hematíes empleados eran del grupo sanguíneo O con A.C.D. de anticoagulante, se lavaron inicialmente cuatro veces sin ser sometidos a tratamiento con diez veces su volumen de solución P.B.S. de pH 7.4. Todas las centrifugaciones que se llevaron a cabo se hicieron a 400 gs. y a temperatura ambiente durante cinco minutos.

Se fijaron los hematíes durante cuatro horas con agitación constante. Se utilizaba para ello una suspensión de hematíes al 10% en solución de glutaraldehído al 2% en P.B.S. Para retirar el glutaraldehído que no se había unido a las membranas se sometían a diez lavados con P.B.S. con sus correspondientes centrifugaciones. Y una vez limpios del glutaraldehído sobrante se procedió a la liofilización para su mejor conservación.

Unión de la lectina del extracto del Myrtus por los hematíes fijados con glutaraldehído

a) Obtención del extracto de semillas del myrtus Communis.

Se parte de semillas pulverizadas. El polvo fué puesto a macerar en la proporción de un 10% durante veinticuatro horas con al-

cohol de 96%, con agitación intermitente; se centrifugaban y se recogían los sobrenadantes, que se evaporaban a baja presión, reconstruyendo el extracto con agua destilada, y liofilizándolo a continuación para su mejor conservación.

b) Fijación de la lectina.

Para la unión de la lectina al hematíe previamente fijado con el glutaraldehído, se disuelven 1'5 g de extracto de *Myrtus* liofilizado en 100 cc de solución buffer de Mc Ilvaine a pH 5. Se preparó la cantidad suficiente para que se produjese una saturación del hematíe. La fijación era seguida mediante espectroscopía de absorción ultravioleta, siendo la región especialmente observada la de $\lambda = 280$ nm. Se proseguía la adición de extracto hasta que hubiese una igualdad de absorbancia en la longitud de onda antes dicha entre el extracto que no ha estado en contacto con los hematíes y el que ha estado en contacto con ellos. Conseguida esa igualdad de absorbancia interpretamos que hay una saturación de lectina por parte del hematíe, continuando el proceso con lavados sucesivos de solución buffer de Mc Ilvaine de pH 5 hasta que los líquidos de lavado no den absorbancia; con ello eliminamos las moléculas de lectinas débilmente unidas al soporte. Una vez limpio el sistema se procede a su liofilización para su conservación y constituye el sistema que denominaremos HCM (hematíes-glutaraldehído-mirto).

Influencia del pH en la estabilidad del sistema HG

El primer estudio lo hicimos sobre la estabilidad del hematíe fijado con glutaraldehído pero que no contenía lectina de *Myrtus*. Para dicho estudio se hicieron series de 20 mg del sistema HG que se ponían en contacto con 5 ml. de solución buffer de Mc Ilvaine a

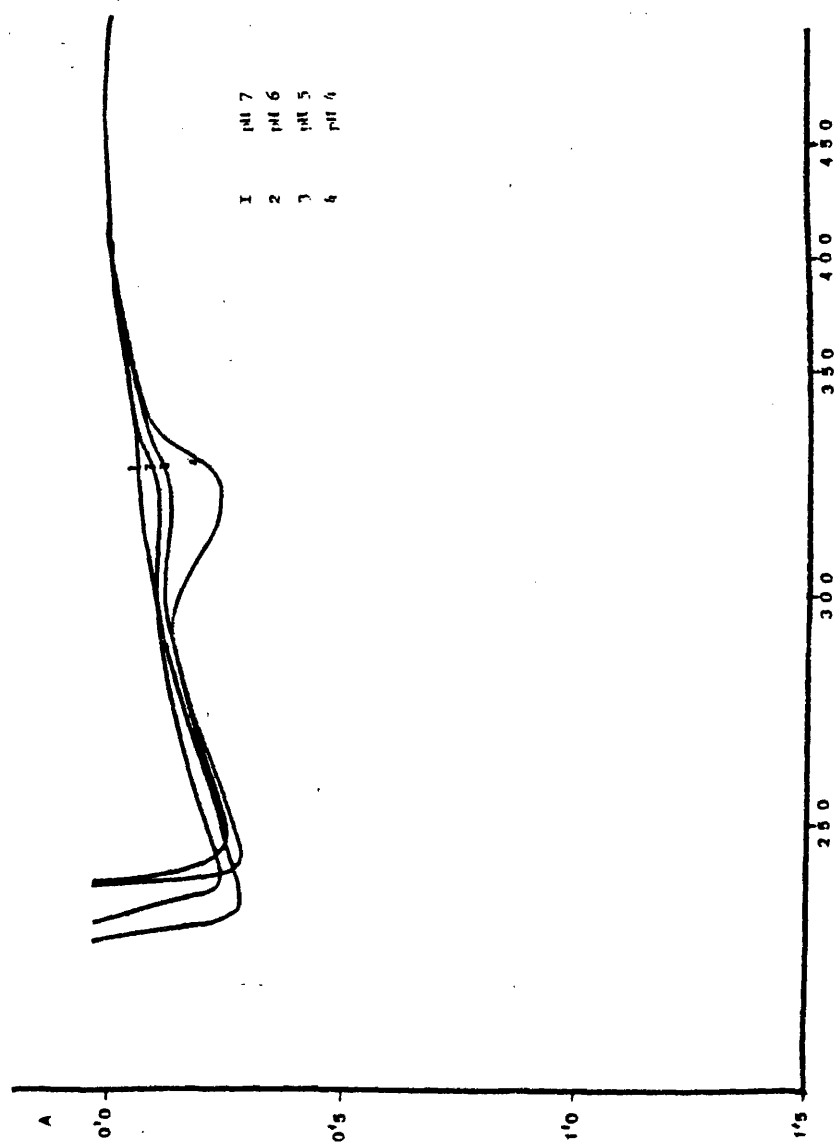


FIG. 1

distintos pH 4, 5, 6, 7, 8 y 9 a temperatura ambiente y con agitación durante tres horas. Pasado el tiempo, los sobrenadantes se recogieron mediante centrifugación a 4000 rpm. durante diez minutos. Una vez recogidos se hicieron con ellos unos espectros de absorción ultravioleta entre las longitudes de onda de 200 y 400 nm. frente a un blanco, que era una solución de buffer correspondiente.

Los espectros realizados se muestran a continuación. Fig (1).

Influencia del pH en la unión de la lectina del Myrtus Communis a los hematíes tratados con glutaraldehído

Para el estudio de la posible influencia del pH sobre la unión se hicieron series con 10 mg de hematíes previamente tratados con glutaraldehído, sistema HG. Este sistema se puso en contacto con 10 ml de una solución de extracto de Myrtus de concentración 0'1 mg/100 ml en una solución buffer de Mc Ilvaine a distintos pH, con agitación durante treinta minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, se centrifugaba el sistema durante diez minutos a 4000 rpm, se recogían los sobrenadantes y con ellos se hacían las experiencias. Los pH propuestos fueron los siguientes 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

La unión fué seguida por espectrofotometría ultravioleta, mediante barridos de espectro en las longitudes de onda de 200 y 400 nm. La zona escogida para estudiar la interacción fué la de 280 nm., ya que por trabajos anteriores se ha visto una relación entre el poder aglutinante y la absorción en la región del ultravioleta antes mencionada. Las absorbancias debidas a los sobrenadantes eran comparadas con

las de los extractos que no habían estado en contacto con el sistema HG. Aquel pH que presentase una mayor diferencia de absorbancia entre el extracto puro y el que ha estado en contacto con los hematíes consideramos que es el más adecuado para la unión de la lectina a la membrana del hematíe.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla I.

Tabla I.

| pH | A extracto a 280 nm. | A sobrenadante a 280 nm. | diferencia |
|----|-------------------------|-----------------------------|------------|
| 2 | 1'11 | 0'07 | 1'04 |
| 3 | 0'95 | 0'15 | 0'80 |
| 4 | 1'27 | 0'19 | 1'08 |
| 5 | 1'24 | 0'28 | 0'96 |
| 6 | 1'01 | 0'23 | 0'78 |
| 7 | 0'90 | 0'26 | 0'64 |
| 8 | 1'07 | 0'41 | 0'66 |

Con objeto de ver el tiempo que necesita la lectina para unirse a la membrana y poder formar el sistema HGM, se hicieron series de 20 mg del sistema HG con 5 ml de una solución de extracto de Myrtus de 0'1 mg /100 en solución buffer de Mc Ilvaine a pH 5, a temperatura ambiente durante 5, 10, 20 y 30 minutos con agitación; pasado el tiempo se centrifugaba la serie correspondiente y se hacía un espectro de absorción entre 200 y 400 nm., observándose que a los diez minutos de exposición parecía que se había producido la saturación del hematíe de la lectina.

Influencia del pH y de la temperatura en la estabilidad del sistema HGM.

a) Influencia del pH.

Para la realización de esta prueba se hicieron series que contenían 20 mg del sistema HGM, que se ponían en contacto con soluciones buffer de Mc Ilvaine de distintos pH 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y se mantenían a temperatura ambiente, con agitación, durante tres horas. Pasado el tiempo se recogían los sobrenadantes mediante centrifugación como se ha expuesto anteriormente. Con los sobrenadantes recogidos se hicieron una serie de espectros entre las longitudes de onda de 200 y 400 nm. Se comprobó que había un incremento de absorbancia al incrementar el pH, siendo el blanco utilizado para la medida la solución buffer de pH correspondiente.

Los datos obtenidos fueron los siguientes:

| <u>pH</u> | <u>A $\lambda = 280 \text{ nm.}$</u> |
|-----------|---|
| 4 | 0'34 |
| 5 | 0'26 |
| 6 | 0'31 |
| 7 | 0'69 |
| 8 | 1'41 |
| 9 | 1'29 (1) |

(1) El sistema HGM sometido a pH 9 necesitó de una dilución al 50% para poder ser medido.

b) Influencia de la temperatura.

Para el estudio se dispuso del sistema HCM en soluciones buffer de pH 6'7. Una serie de 20 mg, se puso en contacto con 3 ml de la solución buffer, durante una hora, a distintas temperaturas de 30, 40, 50, 60 y 70°C con agitación; una vez pasado el tiempo se retiraban los sobrenadantes por centrifugación como en los casos anteriores y con ellos, una vez diluidos al 50% con la solución buffer, se hacían los espectros de absorción ultravioleta en los mismos intervalos de longitudes de onda que en los casos anteriores y usando como blanco la solución buffer. Se observaron unas variaciones de absorbancias en todo el espectro. La variación de las absorbancias en la región de los 280 nm. fueron las siguientes:

Tabla III.

| <u>°C</u> | <u>A a 280 nm.</u> |
|-----------|--------------------|
| 30 | 0'30 |
| 40 | 0'52 |
| 50 | 0'89 |
| 60 | 1'04 |
| 70 | 1'20 |

Inmovilización de la ureasa.

Generalmente se utilizaron 100 mg del sistema HGM liofilizados que, previamente embebidos con 1 ml de una solución buffer Mc Ilvaine de pH 6, eran puestos en contacto con 10 ml de una solución de ureasa de 1 mg/ml de concentración en la misma solución buffer anterior. Se les sometía a agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos, centrifugando y retirando el sobrenadante. Los hematíes eran lavados con la misma solución buffer, hasta que los líquidos de lavado no mostrasen absorbancia a $\lambda = 280 \text{ nm.}$. Ello constituye el sistema de enzima inmovilizada que denominaremos HGMU y que posteriormente liofilizaremos para su conservación.

En el proceso de inmovilización se producía una pérdida de actividad de 47% . Esta pérdida puede ser en gran parte debida a la solubilización de la ureasa debilmente unida al soporte, a la posible inactivación de la enzima en el proceso de inmovilización ó a la desactivación que es posible que se produzca en los sucesivos lavados con la solución buffer.

Fué bastante difícil de precisar la cantidad real de ureasa que se ha unido por mg de hematíe, ya que el proceso de unión va seguido de no menos de seis lavados, y de un proceso de liofilización, aunque se da el hecho de que en este último proceso no hay pérdidas aparentes de actividad.

Para conocer las propiedades de la ureasa inmovilizada en el sistema HGM se efectuaron diversas pruebas:

- 1) Influencia del pH en la inmovilización de la ureasa al sistema HGM.
- 2) Influencia del pH en la actividad de la enzima.
- 3) Influencia de la temperatura en la actividad del enzima.
- 4) Estabilidad de la enzima inmovilizada en la conservación.
- 5) Estabilidad de la enzima inmovilizada a la acción sucesiva de sustratos diferentes.
- 6) Estabilidad de la enzima inmovilizada a la acción de soluciones de distintos pH y a temperaturas igualmente diferentes.
- 7) Efecto de los inhibidores.
- 8) Determinación de la constante de Michaelis.

Influencia del pH en la inmovilización de la ureasa.

Siguiendo la metodología general, era puesto en contacto el sistema HGM con soluciones de ureasa a pH 6, 7 y 8. El proceso de inmovilización fué seguido observando la variación de la actividad de los sobrenadantes puestos en contacto con el sistema HGM. Tras treinta minutos de agitación a temperatura ambiente se centrifugaba el sistema y con los sobrenadantes, se hicieron medidas para ver su actividad residual por el método general.

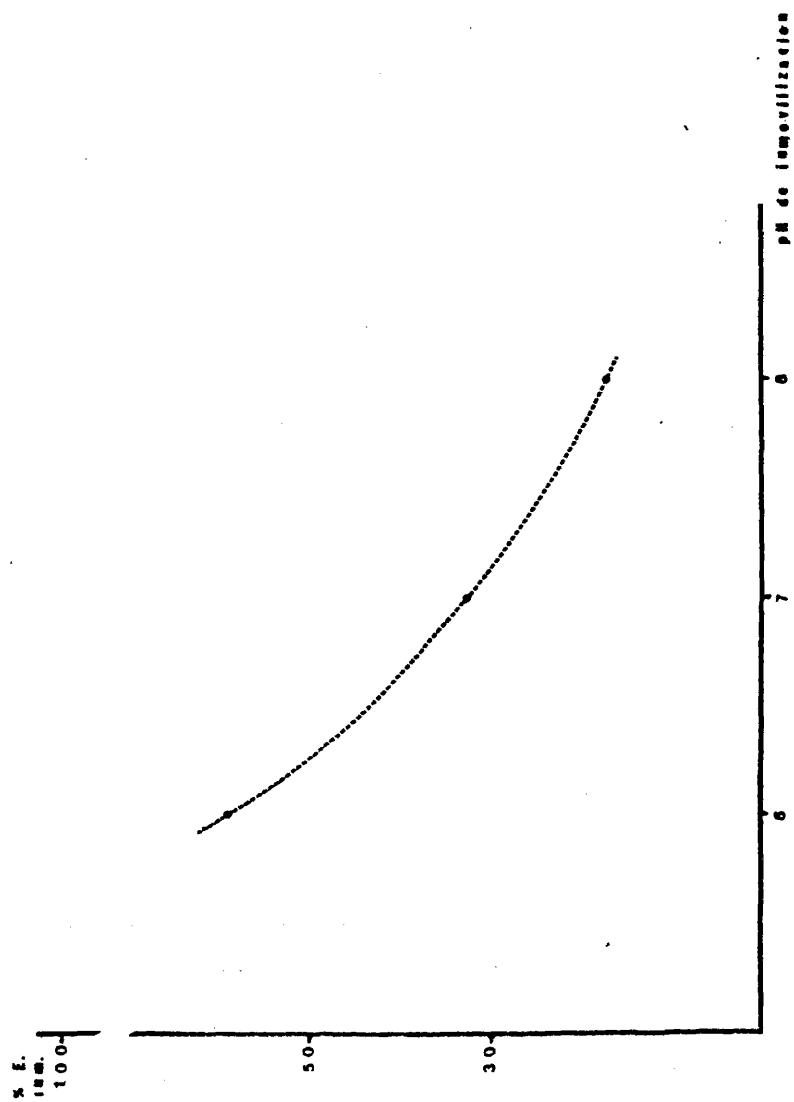


Fig. 2 Influencia del pH en la unión de la ureasa al sistema HCN.

En la Tabla IV nos muestran los siguientes resultados:

Tabla IV

| <u>pH</u> | <u>% de actividad de los sobrenadantes</u> | | | <u>valor medio sobrenadante</u> | <u>valor medio inmovilizado</u> |
|-----------|--|----|----|---------------------------------|---------------------------------|
| 6 | 30 | 42 | 50 | 40'6% | 59'4% |
| 7 | 65 | 68 | 67 | 66'7% | 33'3% |
| 8 | 82 | 80 | 85 | 82'3% | 17'7% |

Para valores de pH inferiores a 6 no hubo inmovilización ya que había una clara insolubilidad por ser su punto isoeléctrico 5.

Vistas la grandes ventajas para la inmovilización de esta enzima a pH 6, se escogió este pH para lograr un mayor rendimiento en el proceso, y en estas condiciones se realizó la metódica de trabajo de inmovilización.

Estudios realizados con el inmovilizado de ureasa HGMU.

La determinación de la actividad enzimática se siguió por el método de Fawcett y Scott (123) que se funda en la formación de carbonato amónico a partir de la urea por la acción de la ureasa, y valorando dicho carbonato posteriormente por la formación de un complejo coloreado con los reactivos de fenol e hipoclorito.

El sustrato empleado era una solución de urea de 0'5 mM en solución buffer Mc Ilvaine de pH 6'7. Se utilizó este pH ya que entra dentro del margen recomendado (6'5-6'9), ya que a un pH más alcalino podría haber una producción de carbamato amónico que lentamente pasaría a carbonato; y en el caso de pH más ácido podría

haber una inactivación.

La solución de sustrato de trabajo era de 0'03 mg/ml en el mismo buffer de Mc Ilvaine. Su preparación para los ensayos comparativos era siempre extemporánea.

Para medir la actividad enzimática de la enzima inmovilizada la metodología a lo largo de todas las determinaciones se detalla a continuación.

Técnica de trabajo para la determinación de la actividad del sistema inmovilizado.

A 20 mg del sistema HGMU se pusieron 1 ml de solución buffer a pH de trabajo para humedecerlo, se centrifugó y retiró el sobrenadante. Seguidamente se añadía 0'1 ml de la misma solución buffer y 0'2 ml de solución de sustrato de urea de 3 mg/100 ml de concentración disuelta en la solución buffer anterior. Se incubaba durante diez minutos con agitación intermitente a 37°C; pasado el tiempo se enfriaba para parar la reacción centrifugando a continuación durante diez minutos. Se tomaban 0'15 ml del sobrenadante y se hacían reaccionar con los reactivos fenol-hipoclorito sódico que, tras una incubación de quince minutos a 37°C, permitía una lectura espectrofotométrica a 550 nm frente a un blanco de reactivo.

A efectos de comparación se hicieron en algunos casos estudios paralelos con ureasa soluble para determinación de su actividad. En estos casos se utilizaba la misma técnica de trabajo, pero con la diferencia de que la ureasa estaba en una solución de buffer de Mc Ilvaine a pH correspondiente y de 1 mg/ml de concentración; no habiendo necesidad de centrifugación y siendo el resto del procedi

miento es el mismo.

Influencia del pH en la actividad enzimática.

Se prepararon soluciones de ureasa en buffer de Mc Ilvaine de pH 5, 6, 7, 8 y 9 de 1 mg/ml de concentración y suspensiones de 200 mg del sistema inmovilizado en las mismas soluciones buffer. Los sustratos estaban igualmente a estos mismos pH con una concentración de urea de 0'5 mM, siendo en todos la temperatura de 37°C y los tiempos iguales a como se señala en la técnica anteriormente descrita.

En este caso, como en el anterior, se da el valor de 100% de actividad a aquella en que esta es máxima. Los resultados quedan reflejados en la Tabla V.

Tabla V.

% actividad ureasa en solución

| pH | ensayos | 1 | 2 | 3 | Valor medio |
|-----|---------|------|------|------|-------------|
| 5 | | 0 | 0 | 5 | 1'7 |
| 6 | | 22'8 | 17'6 | 16'7 | 19 |
| 6'7 | | 74'3 | 70'6 | 72'2 | 72'4 |
| 7 | | 82'8 | 88'2 | 86'1 | 85'7 |
| 8 | | 97'1 | 100 | 100 | 99 |
| 9 | | 100 | 100 | 100 | 100 |

% actividad sistema HGMU

| pH | ensayos | 1 | 2 | 3 | Valor medio |
|-----|---------|------|------|------|-------------|
| 5 | | 20 | 21'1 | 21'4 | 20'8 |
| 6 | | 36'7 | 33'2 | 35'7 | 35'2 |
| 6'7 | | 86'7 | 95 | 89'3 | 90'5 |
| 7 | | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 8 | | 93'3 | 95'1 | 92'9 | 93'8 |
| 9 | | 80 | 88 | 85'7 | 84'6 |

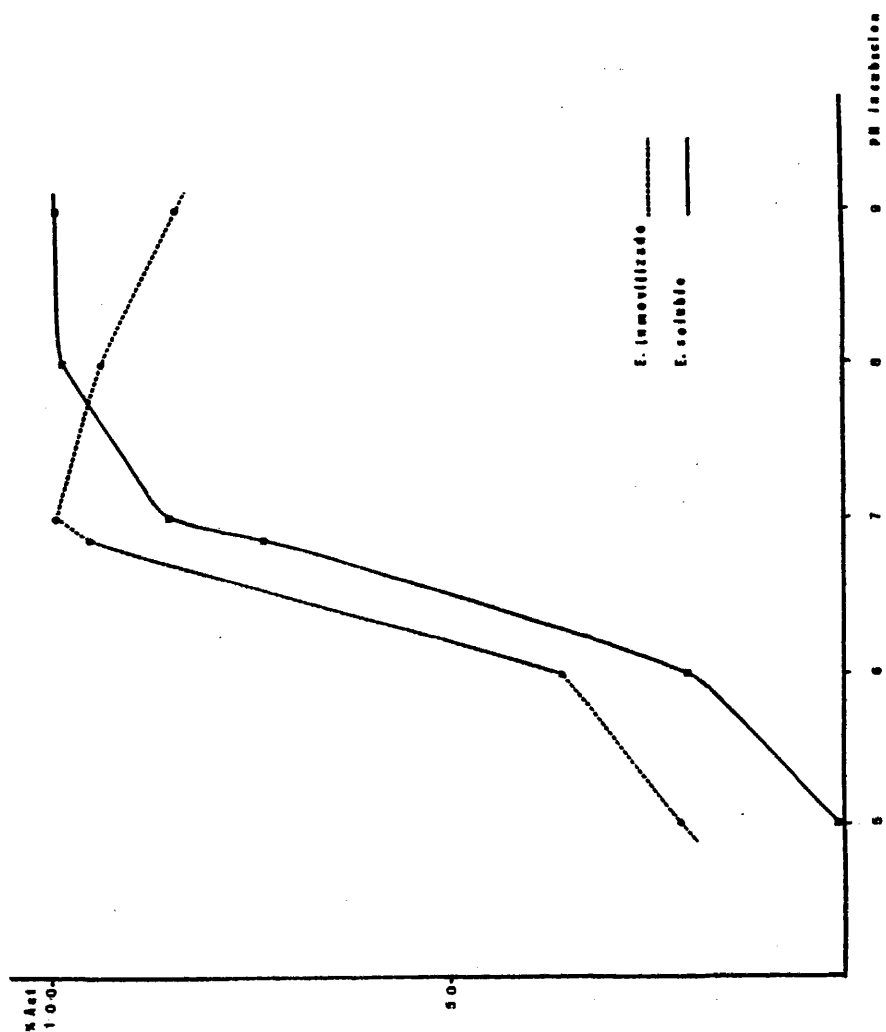


Fig.-3 Variación de la actividad de la ureasa al modificar el pH de incubación.

Influencia de la temperatura en la actividad enzimática.

Para su estudio se prepararon soluciones de ureasa de 1 mg/ml de concentración en soluciones buffer de Mc Ilvaine a pH de trabajo 6'7 , y con el sistema inmovilizado HGMU se hicieron suspensiones con las mismas soluciones buffer. Añadiéndolas soluciones de sustrato de 0'5 mM de concentración en soluciones buffer de trabajo. Para la medida de la actividad se realizaron las técnicas anteriormente descritas pero variando las temperaturas de incubación a 30, 40, 50, 60 y 70°C respectivamente.

Los valores medios de la actividad quedan reflejados en la siguiente Tabla.

Tabla VI

% actividad ureasa en solución

| Temperatura °C | ensayos | 1º | 2º | 3º | Valor medio |
|-------------------|---------|------|------|------|-------------|
| 30 | | 47 | 43'7 | 53'3 | 48 |
| 40 | | 75 | 84'3 | 80 | 79'8 |
| 50 | | 94 | 93'7 | 100 | 95'8 |
| 60 | | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 70 | | 90'6 | 93'7 | 96'6 | 93'7 |

% actividad sistema HGMU

| Temperatura °C | ensayos | 1º | 2º | 3º | Valor medio |
|-------------------|---------|------|------|------|-------------|
| 30 | | 66 | 72'5 | 73 | 71'3 |
| 40 | | 68'1 | 80 | 63'6 | 70'6 |
| 50 | | 72'7 | 85 | 73 | 76'8 |
| 60 | | 79'5 | 90 | 86'3 | 85'3 |
| 70 | | 100 | 100 | 100 | 100 |

Como en el caso anterior el 100% de actividad se da a aquel en que ésta sea máxima.

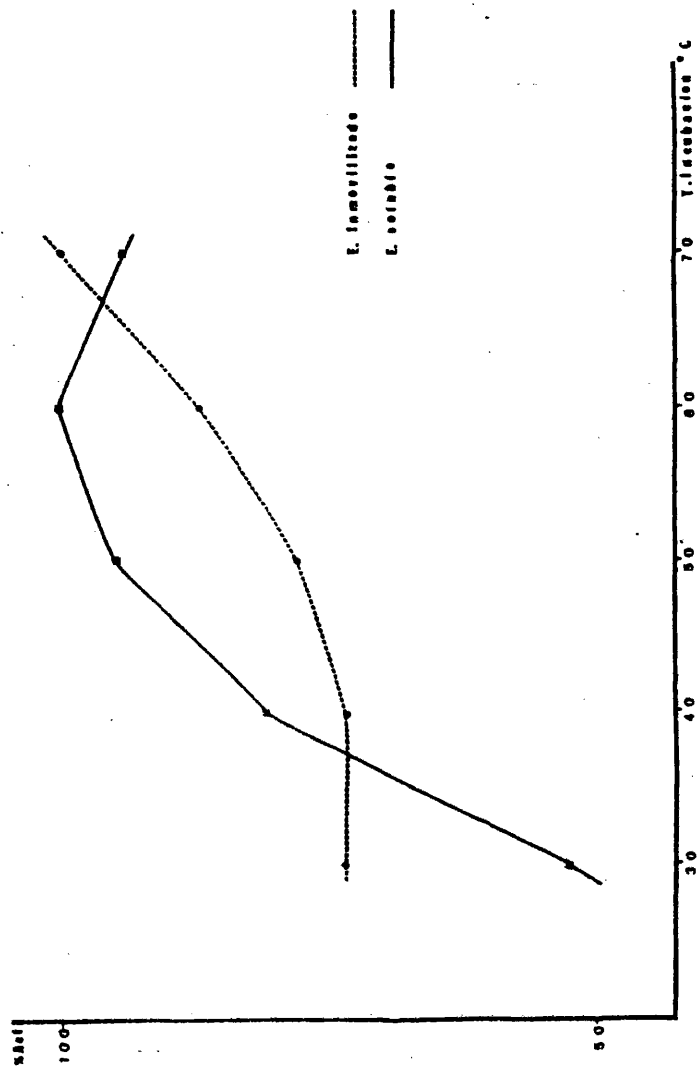


Fig. 4 Variación de la actividad de los urones al modificar la temperatura de incubación.

Estabilidad del sistema HCMU durante la conservación.

Esta prueba se realizó sólo con el sistema inmovilizado, ya que creemos que es de gran importancia para posibles aplicaciones del sistema.

Para su estudio el sistema HCMU se conservaba de dos formas, una liofilizada y la otra en forma de suspensión. El sistema en suspensión eran 20 mg del sistema HCMU en solución buffer de Mc Ilvaine a pH 6'7 con trazas de estreptomicina para evitar el crecimiento de microorganismos. Las dos formas de almacenamiento estuvieron en dos condiciones de temperatura. En frigorífico a 4°C ó a temperatura ambiente 17-25°C.

Para representar el 100% de actividad, se ha dado este valor a la que corresponde al primer día de la preparación del sistema, y con relación a ésta se expresaron las de los días sucesivos.

Tabla VII

% actividad HGMU liofilizados

a) A temperatura ambiente

| | <u>ensayos</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>Valor medio</u> |
|--------------------------------|----------------|----------|----------|--------------------|
| <u>Tiempo conserv. (días).</u> | | | | |
| 1 | | 100 | 100 | 100 |
| 2 | | 82'6 | 83'3 | 83 |
| 3 | | 82'6 | 75'0 | 78'8 |
| 7 | | 78'3 | 71'0 | 74'6 |
| 21 | | 56'8 | 52'0 | 54'4 |
| 30 | | 47'8 | 46'0 | 46'9 |

b) En frigorífico

| | <u>ensayos</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>Valor medio</u> |
|--------------------------------|----------------|----------|----------|--------------------|
| <u>Tiempo conserv. (días).</u> | | | | |
| 1 | | 100 | 100 | 100 |
| 2 | | 82'6 | 76 | 79'3 |
| 3 | | 78'2 | 76 | 77'1 |
| 7 | | 69'5 | 60 | 64'7 |
| 21 | | 60'8 | 56 | 58'4 |
| 30 | | 60'8 | 52 | 56'4 |

Tabla VIII

% actividad HGMU suspensión pH 6'7

a) Temperatura ambiente

| <u>ensayos</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>Valor medio</u> |
|-------------------------------|----------|----------|--------------------|
| Tiempo conserv. (días). | | | |
| 1 | 100 | 100 | 100 |
| 2 | 89'3 | 96'4 | 92'9 |
| 3 | 85'7 | 82'1 | 83'9 |
| 7 | 78'5 | 71'4 | 75'0 |
| 21 | 82'1 | 60'7 | 62'5 |
| 30 | 57'1 | 53'5 | 55'4 |

b) En frigorífico

| <u>ensayos</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>Valor medio</u> |
|------------------------------|----------|----------|--------------------|
| Tiempo conserv. (días) | | | |
| 1 | 100 | 100 | 100 |
| 2 | 86'9 | 76 | 81'4 |
| 3 | 86'9 | 76 | 81'4 |
| 7 | 69 | 62'5 | 65'7 |
| 21 | 63 | 60 | 61'5 |
| 30 | 60'8 | 60 | 60,4 |

Tabla IX
(Tabla resumen)

| Tiempo conserv. (días). | % actividad HGMU <u>liofilizadas</u> | | % actividad HGMU <u>suspensión pH 6'7</u> | |
|-------------------------------|---|-----------------------------|--|-----------------------------|
| | Temperatura | Frigorífico | Temperatura | Frigorífico |
| | <u>ambiente</u> | <u> </u> | <u>ambiente</u> | <u> </u> |
| 1 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 2 | 92'9 | 81'4 | 83 | 79'3 |
| 3 | 83'9 | 81'4 | 78'8 | 77'1 |
| 7 | 75'0 | 65'7 | 74'6 | 64'7 |
| 21 | 62'5 | 61'5 | 54'4 | 58'4 |
| 30 | 55'4 | 60'4 | 46'9 | 56'4 |

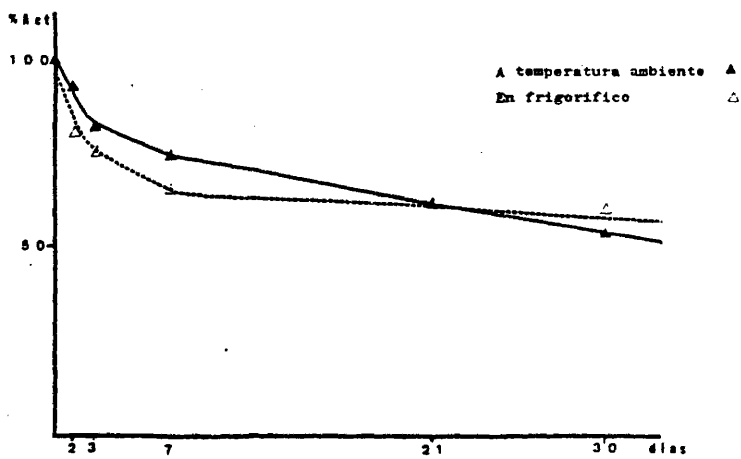


Fig. 5 Estabilidad del sistema HGMU en forma de liofilizado durante la conservación.

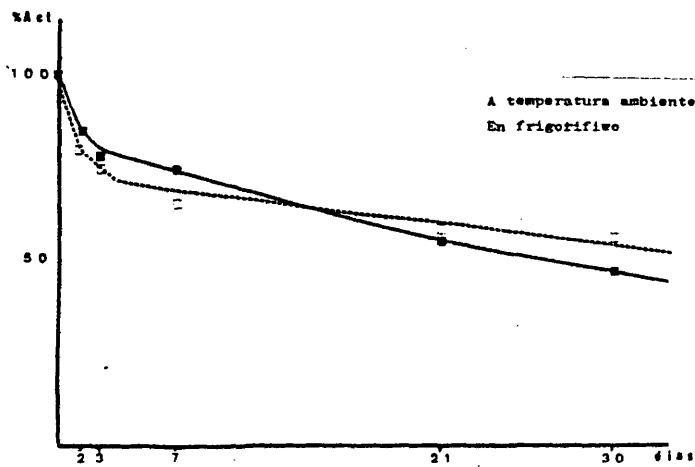


Fig. 6 Estabilidad del sistema HGMU en suspensión durante la conservación.

Estabilidad del sistema HGMU a la acción de sucesivos pases de sustratos.

Con esta prueba pretendíamos ver la estabilidad del sistema de enzima inmovilizado HGMU a la acción de sucesivos pases de sustratos. Una vez que acababa el tiempo de incubación se procedía a extraer el producto de la reacción sin necesidad de desactivar ó desnaturalizar la enzima, como se debería proceder con una enzima soluble, y así volverla a usar indefinidamente.

Se intentó el ensayo mediante el empleo de una pequeña columna con el sistema HGMU en su interior, y reciclando el sustrato de urea a través del mismo, pero encontramos dificultades de flujo debido a la propia naturaleza del sistema. Se siguió entonces la técnica general, con 20 mg del sistema HGMU y una solución de trabajo de urea de 0'5 mM de concentración y a pH 6'7; poniendo 0'2 ml de la anterior solución y 0'1 ml de la solución buffer. Tras la incubación se recogía el sobrenadante de la centrifugación y en él se determina la urea que había sido degradada deduciendo de ella la actividad de la enzima. El sistema HGMU centrifugado se lavaba con 2 ml de solución buffer y se le añadía a un nuevo volumen del sustrato de urea, repitiéndose el proceso hasta siete veces.

El 100% de actividad se ha dado a la actividad que tiene el sistema en el primer paso y con relación a éste se expresaron las actividades de los pasos sucesivos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

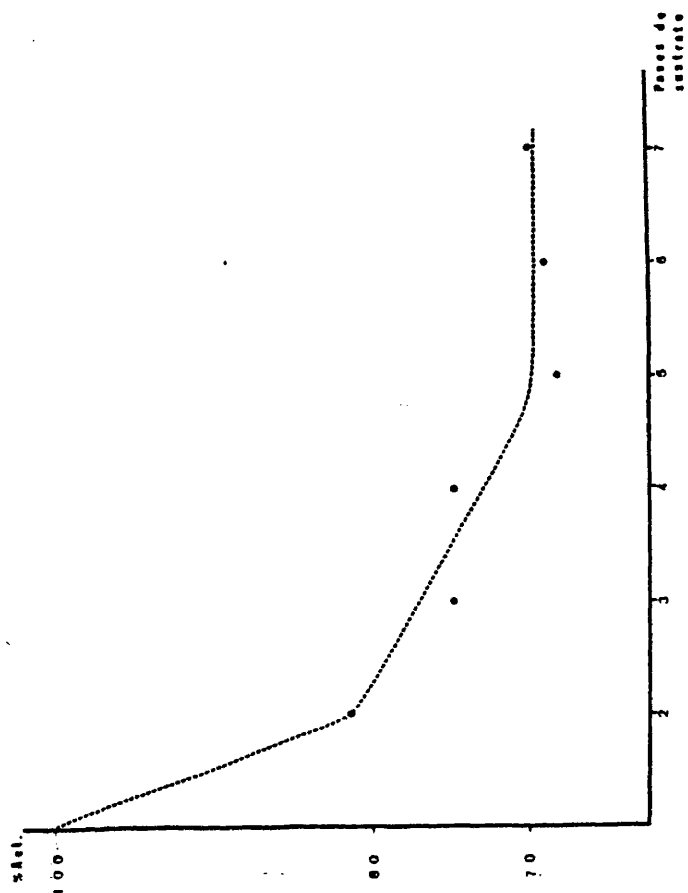


FIG. 7 Estabilidad del sistema HCU n.º en acción de sucesivos pasos de sustrato.

Tabla X.

| Nº de pases | % actividad residual. | | Valor medio |
|-------------|-----------------------|------|-------------|
| | ensayos 1 | 2 | |
| 1 | 100 | 100 | 100 |
| 2 | 82'1 | 78'6 | 80'4 |
| 3 | 78'5 | 71'4 | 75 |
| 4 | 78'5 | 71'4 | 75 |
| 5 | 71'4 | 64'3 | 68 |
| 6 | 71'4 | 67'8 | 69 |
| 7 | 70 | 71'4 | 70 |

Estabilidad del sistema HGMU^a a la acción de soluciones de distintos pH y a diferentes temperaturas.

a) Estabilidad del sistema a distintos pH.

Se prepararon una serie de muestrnas de 20 mg y a estas se le añadieron 5 ml de soluciones buffer de Mc Ilvaine de pH 5, 6, 7 y 8 manteniéndolas con agitación y a temperatura ambiente durante tres horas. Pasado el tiempo referido se centrifugaba recogiendo los sobrenadantes y añadiendo a continuación la solución de sustrato, determinándose la actividad residual de cada sistema no sometido a tratamiento y al que se le daba un valor relativo de 100% de actividad enzimática.

Los resultados se expresan a continuación.

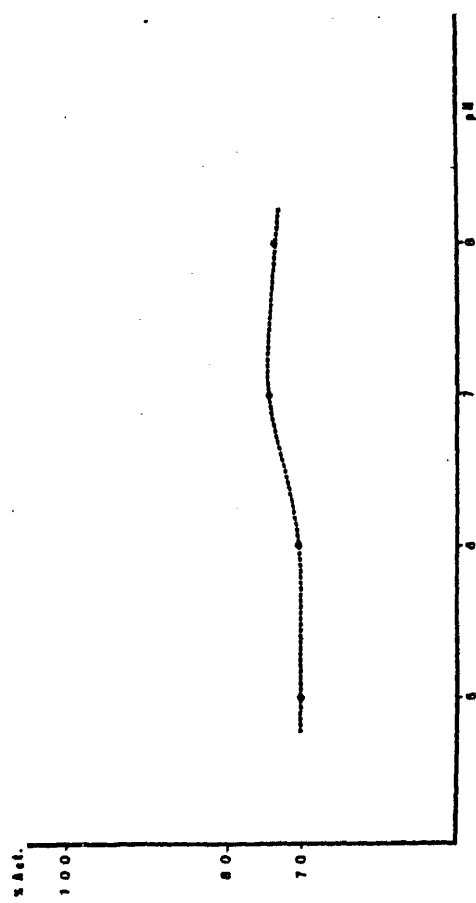


Fig. 8 Estabilidad del sistema KCHU a la acción de soluciones a diver-
sos pH.

Tabla XI

| % actividad HGMU | | | | | |
|------------------|---------|----|----|----|-------------|
| pH | ensayos | 1 | 2 | 3 | Valor medio |
| 5 | | 70 | 76 | 64 | 70 |
| 6 | | 71 | 76 | 64 | 70'3 |
| 7 | | 74 | 77 | 71 | 74'3 |
| 8 | | 74 | 70 | 76 | 73'3 |

b) Estabilidad del sistema respecto a la temperatura.

Para poder conocer el efecto que pudiera tener la temperatura sobre el sistema, se prepararon 20 mg de HGMU a los que se añadieron 3 ml de solución buffer de Mc Ilvaine de pH 6'7, manteniéndolas sesenta minutos, con agitación a temperatura de 30, 40, 50, 60 y 70°C. Centrifugándose a continuación y retirando el sobrenadante. Con el sistema ya separado, se medía su actividad residual aplicando la técnica general. A efectos de comparación, una solución de ureasa de concentración 1 mg/ml en solución buffer de Mc Ilvaine de pH 6'7 se sometía a las mismas condiciones de temperatura, determinando por el método general su actividad residual.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente Tabla.

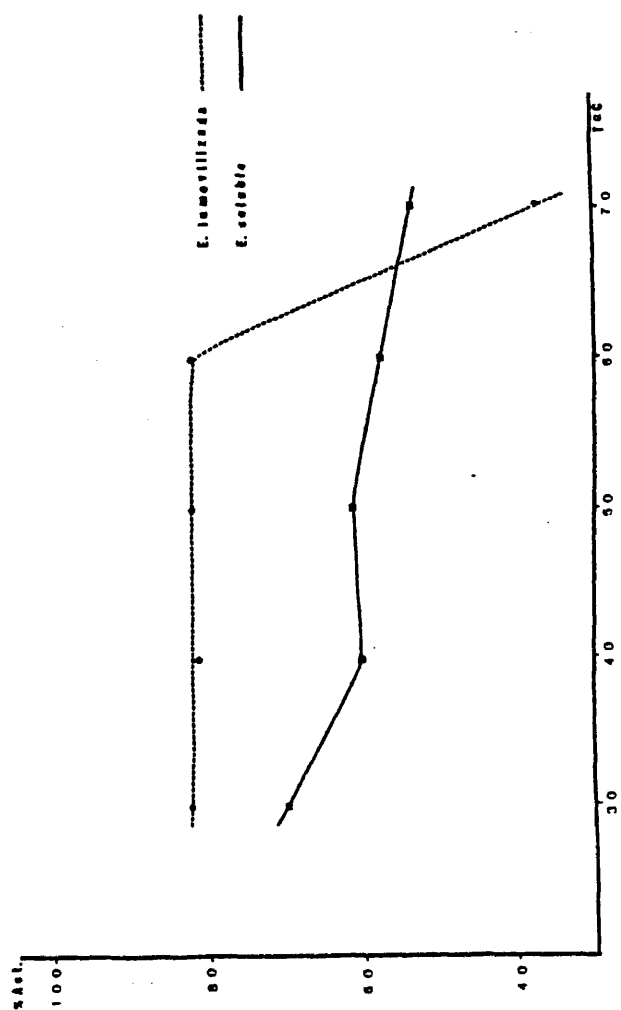


Fig. 9 Estabilidad de la urea a la acción de la temperatura.

Tabla XII

| Temperatura | | % actividad de la enzima soluble | | | |
|-------------|---------|----------------------------------|------|------|-------------|
| °C | ensayos | 1 | 2 | 3 | Valor medio |
| 30 | | 69'2 | 75 | 65'4 | 69'9 |
| 40 | | 61'5 | 58'3 | 61'5 | 60'4 |
| 50 | | 61'5 | 62'5 | 61'5 | 61'8 |
| 60 | | 53'8 | 62'5 | 57'7 | 58 |
| 70 | | 53'8 | 54'1 | 53'8 | 54 |

| Temperatura | | % actividad de la enzima inmovilizada | | | |
|-------------|---------|---------------------------------------|------|------|-------------|
| °C | ensayos | 1 | 2 | 3 | Valor medio |
| 30 | | 93'9 | 77'7 | 76'4 | 82'7 |
| 40 | | 84'8 | 77'7 | 82'3 | 81'7 |
| 50 | | 84'8 | 80'5 | 82'3 | 82'6 |
| 60 | | 84'8 | 83'3 | 82'3 | 83'5 |
| 70 | | 43'4 | 39'8 | 45'0 | 42'8 |

A los sobrenadantes que se retiraron se les hicieron unos espectros de absorción entre las longitudes de onda de 200 y 400 nm. Al variar el pH se observaba un incremento de las absorbancias a incrementos de pH y temperatura. Los resultados obtenidos en la región de $\lambda = 280$ nm. fueron los siguientes.

Tabla XIII.

| pH | A $\lambda = 280$ nm |
|----|----------------------|
| 4 | 0'12 |
| 5 | 0'10 |
| 6 | 0'08 |
| 7 | 0'27 |
| 8 | 1'00 |

Tabla XIV.

| <u>Temperatura</u> | <u>A $\lambda = 280 \text{ nm.}$</u> |
|--------------------|---|
| 30 | 0'17 |
| 40 | 0'30 |
| 50 | 0'58 |
| 60 | 0'72 |
| 70 | 1'10 |

Efectos de inhibidores.

a) Incubación en presencia del catión Cu.

Para conocer el comportamiento del sistema HGMU frente a inhibidores se realizaron una serie de ensayos, empleando ion cobre Cu^{2+} como inhibidor.

Se prepararon soluciones de sustrato de urea de pH 6'7 que contenían concentraciones de cobre de 1, 0'5, 0'1 y 0'05 mg/ml, en los que se determinaba la actividad del sistema HGMU.

Con la enzima soluble se procedió de la misma forma, disolviendo en las soluciones de sulfato de cobre antes citada, ureasa a la concentración de trabajo 1 mg/ml.

Los resultados obtenidos nos muestran los porcentajes de actividad con referencia a las actividades iniciales en ausencia del inhibidor. Los resultados obtenidos en la experiencia se muestran en la Tabla siguiente.

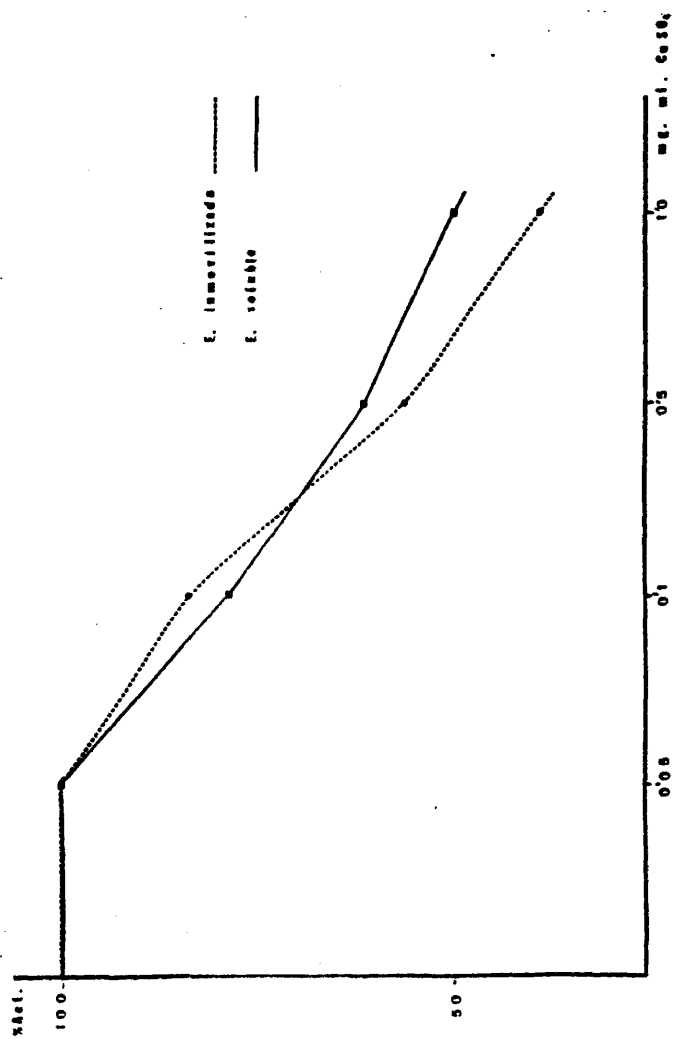


Fig. 10 Estabilidad de la urea frente a la acción del catión Cu^{2+} en la incubación.

Tabla XV.

% actividad de la ureasa soluble

| CuSO_4 (ng/ml) | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
|----------------------------|---------|------|------|-------------|
| 0 | | 100 | 100 | 100 |
| 0'05 | | 100 | 100 | 100 |
| 0'10 | | 76'5 | 80 | 78'2 |
| 0'50 | | 64'7 | 57'1 | 60'9 |
| 1'00 | | 50 | 50 | 50 |

% actividad de la ureasa inmovilizada

| CuSO_4 (ng/ml) | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
|----------------------------|---------|------|------|-------------|
| 0 | | 100 | 100 | 100 |
| 0'05 | | 100 | 100 | 100 |
| 0'10 | | 82'6 | 85'7 | 84'1 |
| 0'50 | | 56'5 | 54'7 | 55'6 |
| 1'00 | | 34'8 | 42'8 | 38'8 |

b) Para estudiar la acción del cobre Cu^{2+} en presencia prolongada, se prepararon soluciones de sulfato de cobre de 1, 0'5, 0'1 y 0'05 mg/ml en una solución buffer de Mc Ilvaine de pH 6'7. Se mantenían en agitación durante cinco horas a temperatura ambiente; pasado el tiempo se retiraba el sobrenadante y en el sistema inmovilizado se realizaba la prueba de actividad residual. Paralelamente se realizaron pruebas con ureasa soluble, la solución de ureasa tenía la misma concentración que las anteriormente descritas.

El 100% de actividad se da al sistema que ha estado en ausencia del catión Cu inhibidor.

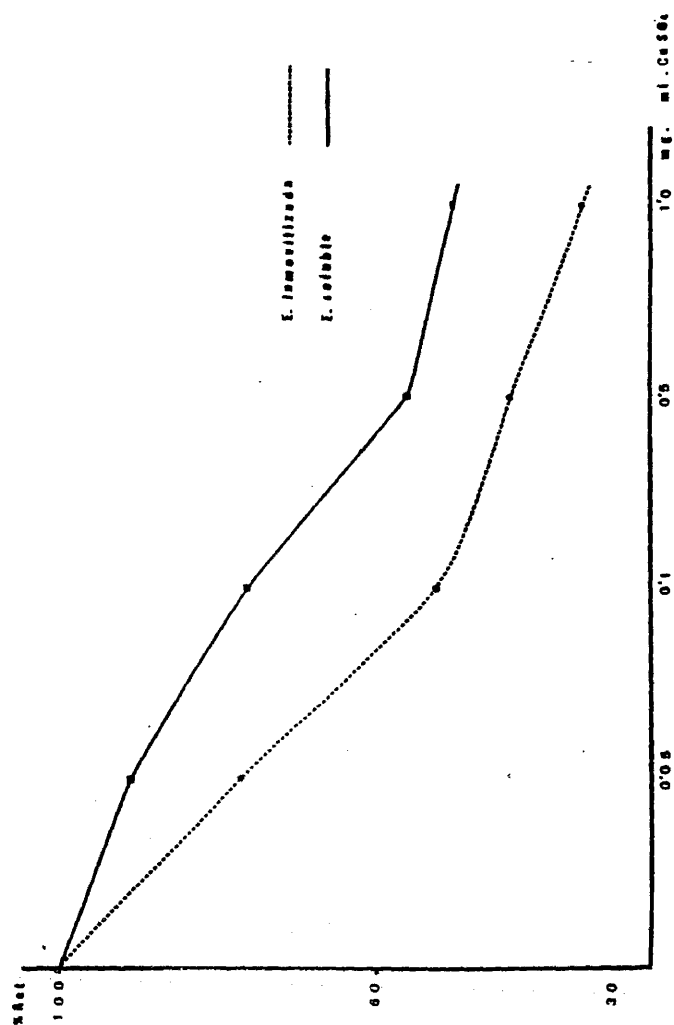


Fig. II Estabilidad de la uronasa frente a la acción del catión Cu^{2+}

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla XVI.

% actividad de la ureasa soluble

| CuSO ₄ (mg/ml) | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
|------------------------------|---------|------|------|-------------|
| 0 | | 100 | 100 | 100 |
| 0'05 | | 92'3 | 91'6 | 91'9 |
| 0'10 | | 84'6 | 66'6 | 75'6 |
| 0'50 | | 61'6 | 50'0 | 55'7 |
| 1'00 | | 50'0 | 50'0 | 50'0 |

% actividad de la ureasa inmovilizada

| CuSO ₄ (mg/ml) | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
|------------------------------|---------|------|------|-------------|
| 0 | | 100 | 100 | 100 |
| 0'05 | | 74'0 | 79'4 | 76'7 |
| 0'10 | | 51'8 | 50 | 50'9 |
| 0'50 | | 44'4 | 41'1 | 42'8 |
| 1'00 | | 37'0 | 29'4 | 34'2 |

Determinación de la constante de Michaelis

Para su consecución se ha seguido el método gráfico de Lineweaver-Burk, representando los valores inversos de velocidades de reacción y de las concentraciones de sustrato en ordenadas y abcisas respectivamente.

Las concentraciones del sustrato para los respectivos ensayos fueron: $2'5 \times 10^{-4}$, 5×10^{-4} , 1×10^{-3} , $1'5 \times 10^{-3}$, $2'5 \times 10^{-3}$ M

Los valores que se obtuvieron para condiciones de trabajo de pH 6'7 y temperatura de incubación de 37°C fueron

| | |
|---------------------|-------------------------|
| Ureasa soluble | $5'32 \times 10^{-3}$ M |
| Ureasa inmovilizada | $2'11 \times 10^{-3}$ M |

El ajuste de estas rectas se llevó a cabo en un Microcomputador Olivetti P 6066.

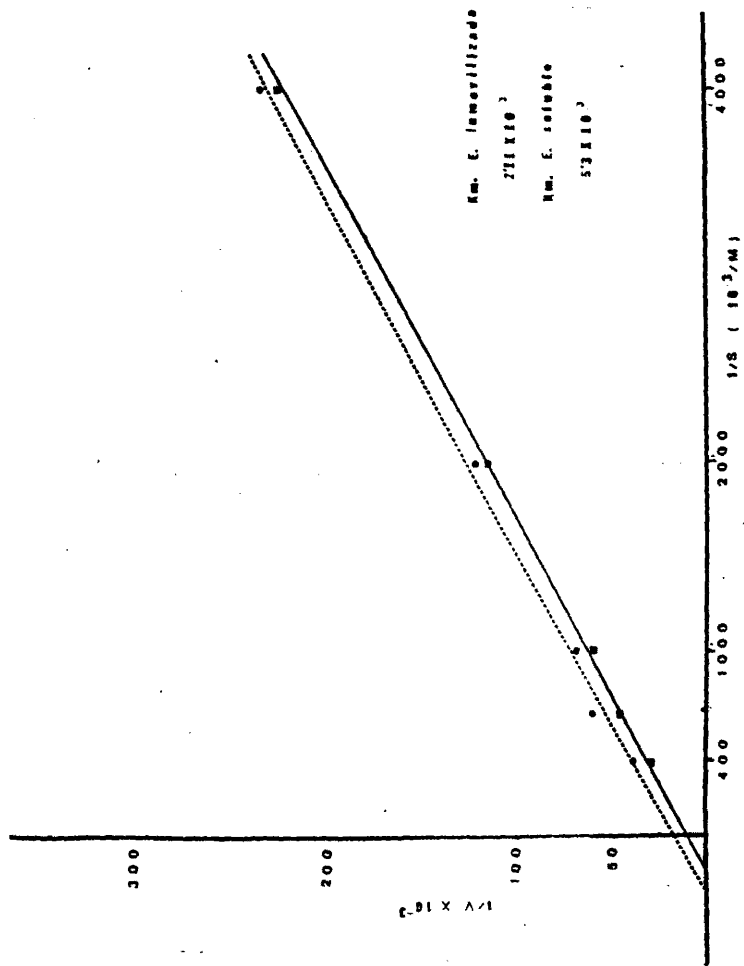


Fig. 12 Determinación de la constante de Michaelis-Menten para la ureasa.

Inmovilización de la α -amilasa al sistema HGM.

Para la inmovilización de la α -amilasa utilizamos 100 mg del sistema HGM liofilizado, previamente embebidos con una solución buffer de fosfatos de pH 5'7, estos eran puestos en contacto con 10 ml de una solución de α -amilasa que contenían 1 mg/100 ml en la misma solución buffer anterior. Se les sometía a agitación a temperatura ambiente durante treinta minutos, centrifugándose y retirando el sobrenadante. Los hematíes eran lavados con la solución buffer, hasta que los líquidos de lavado no mostrasen absorbancia a 280 nm. Ello constituye el sistema de enzima inmovilizada HGMU, y que posteriormente liofilizaremos para su conservación.

Estudios realizados con el inmovilizado de la α -amilasa

La determinación de la actividad enzimática se siguió por el método amiloclástico de Smith y Roe (124), que se funda en la valoración del almidón que no ha sido hidrolizado por la enzima, debido a la formación de un complejo coloreado al añadirle una solución de yodo.

El sustrato que se empleaba era una solución que contenía 6'67 mg/ml de almidón soluble de Litner, buffer de fosfatos de pH 5'7 0'067 y ClNa 0'056 M. La solución de sustrato de trabajo era 6'67 mg/ml de almidón en el buffer de fosfatos con el pH anteriormente reseñado y su preparación para los ensayos comparativos era siempre extemporánea.

Para medir la actividad enzimática de la enzima inmovilizada la metodología a lo largo de todas las determinaciones se detallan a continuación.

Técnica de trabajo para determinación de la actividad del sistema inmovilizado.

A 25 mg del sistema HGMA se añadía 1 ml de solución buffer de pH 5'7 centrifugándose a continuación para retirar el resto no embebido. Una vez realizada esta operación se añadía 4'5 ml de la solución sustrato de trabajo más 0'5 ml de solución buffer de trabajo, se incubaba durante sesenta minutos a 37°C de temperatura. Pasado el tiempo se añadía 1 ml de una solución de HCl N para parar la reacción, se centrifugaba el sistema y se recogía el sobrenadante. Para medir la actividad se cogían 0'5 ml del sobrenadante y se añadían a 35 ml de agua destilada más 1 ml de HCl N, se agregaba después de agitación 1 ml de una solución de yodo normal y se completaba hasta 50 ml con agua destilada midiéndose el color del complejo producido a 630 nm.

El % de actividad se hallaba por diferencias de absorbancias entre una muestra de almidón sin hidrolizar, que sufre los mismos procesos, y la muestra de almidón que ha estado en presencia de la enzima. El 100% de actividad se daba al sistema que producía una mayor diferencia de absorbancias.

A efectos de comparación algunos estudios se han realizado con α -amilasa soluble; la técnica seguida fué la misma que con la inmovilizada, pero utilizando una solución de 0'1 mg/100 ml de concentración añadiendo a la solución sustrato de trabajo 0'5 ml de solución de enzima, el resto de la técnica es similar a la anterior pero sin proceso de centrifugación.

Para conocer las propiedades de la α -amilasa inmovilizada en el sistema HGM se efectuaron diversas pruebas:

- 1) Influencia del pH en la inmovilización de la amilasa al sistema HGM.
- 2) Influencia del pH en la actividad de la enzima.
- 3) Influencia de la temperatura en la actividad de la enzima.
- 4) Estabilidad de la enzima inmovilizada en la conservación.
- 5) Estabilidad de la enzima inmovilizada a la acción sucesiva de sustratos diferentes.
- 6) Estabilidad de la enzima inmovilizada a la acción de soluciones de distintos pH y a temperaturas igualmente diferentes.
- 7) Determinación de la afinidad hacia el sustrato

Influencia del pH sobre la unión de la enzima a la matriz.

Siguiendo la metodología general se pusieron en contacto el sistema HGM con soluciones de α -amilasa a distintos pH (3, 4, 5, 6, 7 y 8). El proceso de la inmovilización era seguido por observación de la actividad residual de los sobrenadantes puestos en contacto con el sistema, con agitación y a temperatura ambiente. Pasados treinta minutos se centrifugaba el sistema, se recogían los sobrenadantes, que eran diluidos en la proporción de 1:10, con su correspondiente solución buffer, y se hacían las medidas de actividad para ver la residual por el método anteriormente indicado.

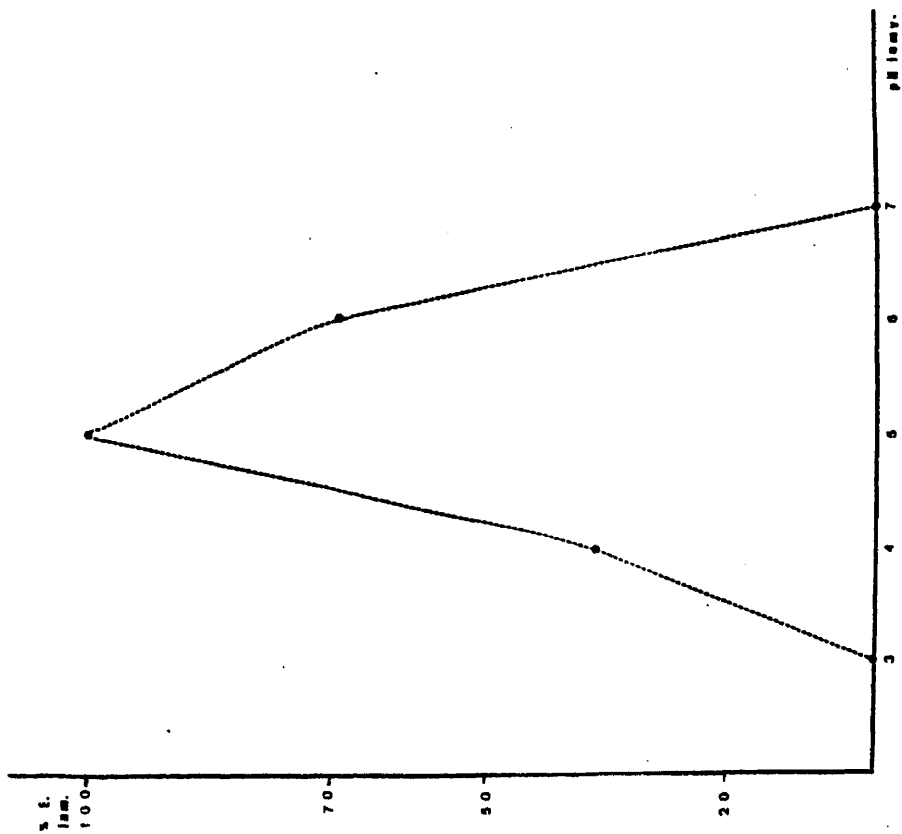


Fig. 13 Influencia en la unión de la A - en línea al sistema B.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla XVII

% de amilasa fijada

| pH | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
|----|---------|------|------|-------------|
| 3 | | 0 | 0 | 0 |
| 4 | | 33'4 | 39'1 | 36'2 |
| 5 | | 100 | 100 | 100 |
| 6 | | 70'3 | 69'5 | 70 |
| 7 | | 0 | 0 | 0 |
| 8 | | 0 | 0 | 0 |

Influencia del pH de incubación en la actividad de α -amilasa

Se prepararon series de amilasa en buffer de fosfatos a distintos pH 4, 5, 5'7, 6, 7 y 8 de concentración mg/ml y suspensiones de 25 mg del sistema inmovilizado en las mismas soluciones buffer, añadiendo la solución sustrato de trabajo a estos mismos pH manteniendo la temperatura de incubación a 37°C, siendo los tiempos los mismos que se señalan en la técnica.

En este caso como en el anterior se da el valor de 100% de actividad a aquella en que ésta es máxima. Los resultados se reflejan en la Tabla siguiente.

Tabla XVIII

Enzima % de actividad residual

soluble

| pH | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
|-----|---------|------|------|-------------|
| 4 | | 10 | 12 | 11 |
| 5 | | 57'1 | 64'3 | 60'7 |
| 5'7 | | 100 | 100 | 100 |
| 6 | | 70 | 66'6 | 68'3 |
| 7 | | 18 | 20 | 19 |
| 8 | | 10 | 0 | 5 |

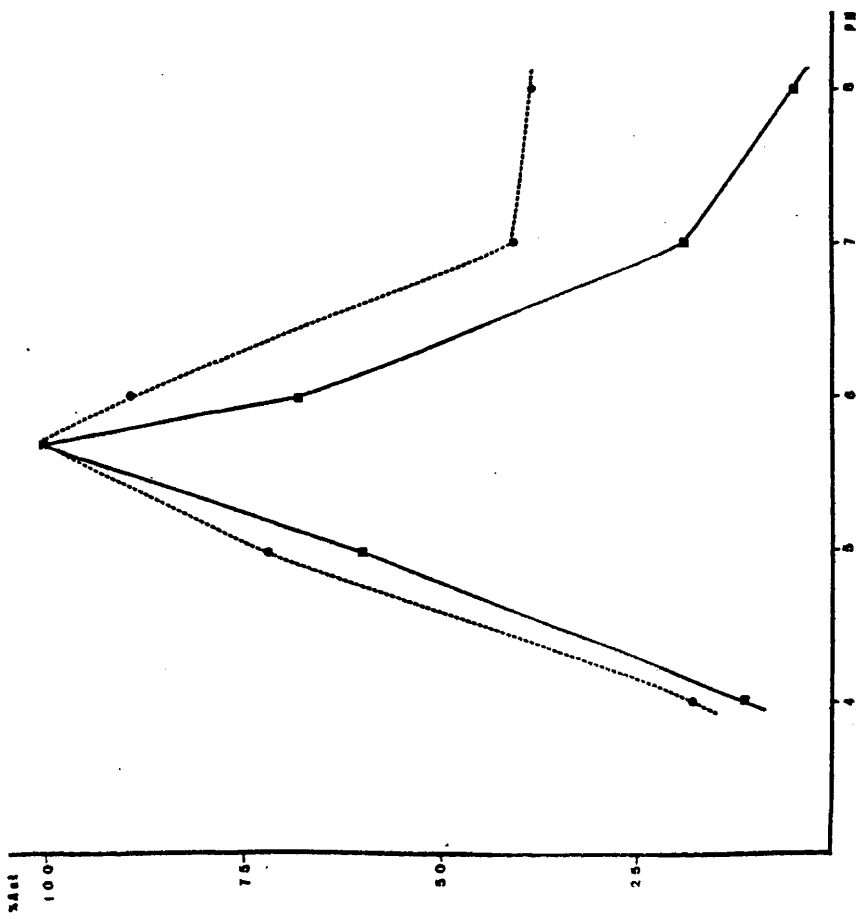


Fig. 14 Variación de la actividad al variar el pH de incubación

| Enzima inmovilizado | | % de actividad residual | | |
|------------------------|---------|-------------------------|------|-------------|
| pH | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
| 4 | | 14'3 | 22'2 | 18'2 |
| 5 | | 71'4 | 72'2 | 71'8 |
| 5'7 | | 100 | 100 | 100 |
| 6 | | 93 | 83'3 | 88'1 |
| 7 | | 45'7 | 37'7 | 41'7 |
| 8 | | 43 | 33'3 | 38'1 |

Influencia de la temperatura en la actividad enzimática

Se prepararon soluciones de amilasa en soluciones buffer de fosfatos de pH 5'7 y de concentración 0'1 mg/100 ml. Con el sistema inmovilizado HGMA se hicieron suspensiones con la solución buffer a los dos sistemas, tanto el soluble como el insoluble, se le añadieron la solución de sustrato de trabajo. Se hicieron las técnicas anteriormente descritas pero con la variación de la temperatura de incubación a 30, 40, 50, 60 y 70°C.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla XIX

| Enzima soluble | | % de actividad residual | | |
|-------------------|---------|-------------------------|------|-------------|
| Temperatura (°C) | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
| 30 | | 13'3 | 13'3 | 13'3 |
| 40 | | 66'6 | 66'6 | 66'6 |
| 50 | | 100 | 100 | 100 |
| 60 | | 46'6 | 53'3 | 50 |
| 70 | | 13'3 | 13'3 | 13'3 |

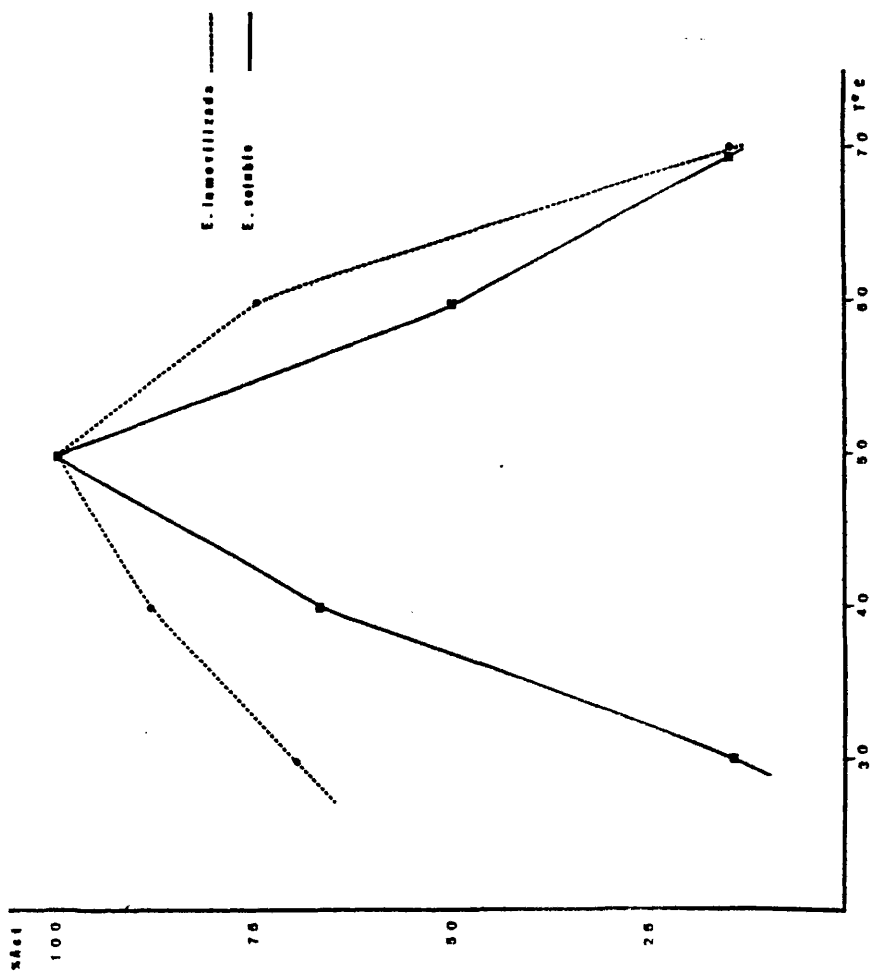


Fig. 15 Variación de la actividad de *E. immitis* al modificar la temperatura de incubación.

| Enzima inmovilizada | | % de actividad residual | | |
|------------------------|---------|-------------------------|------|-------------|
| Temperatura (°C) | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
| 30 | | 70'6 | 68'7 | 69'6 |
| 40 | | 82'3 | 93'7 | 88'0 |
| 50 | | 100 | 100 | 100 |
| 60 | | 76'4 | 93'7 | 85'1 |
| 70 | | 14'7 | 15'6 | 15'1 |

Estabilidad del sistema HGMA durante la conservación.

Esta prueba se realizó en el sistema inmovilizado. Para su estudio conservábamos al sistema en dos formas distintas respecto de la temperatura: a) Conservados en frigorífico a unos 4°C, b) Conservados a una temperatura ambiente. Estos dos grandes grupos a su vez estaban conservados de tres formas distintas: a') Sistema liofilizado en seco, b') El sistema inmovilizado estaba en presencia de una solución buffer de pH 5'7 y con cloruro cálcico, c') El sistema inmovilizado en presencia de una solución buffer de fosfatos de pH 5'7 y en ausencia de cloruro cálcico 0'025M. Se hicieron estas pruebas de estabilidad con 25 mg del sistema HGMA. En el caso de utilización de las soluciones como forma de conservación se añadían trazas de streptomicina para evitar el crecimiento de microorganismos.

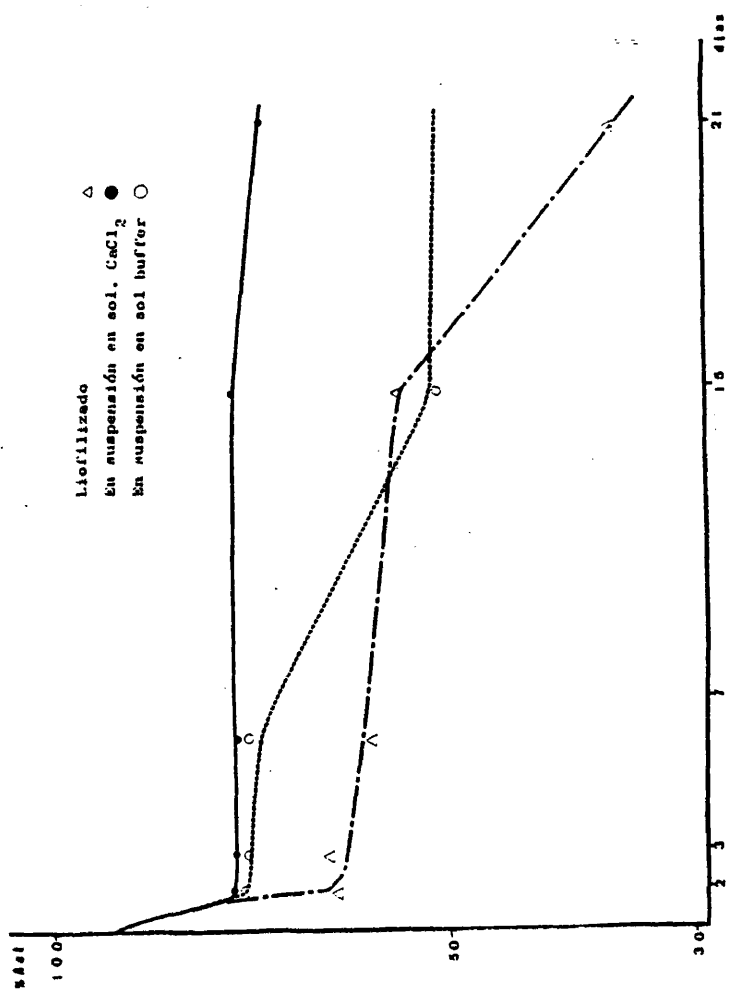


Fig. 16 Variación de la actividad del sistema H₂O durante su conservación a la temperatura de 4° C.

Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

Tabla XX

Conservación en Temperatura a 4°C.

HGMA liofilizado en seco.

| Días | ensayos | % de actividad residual | | Valor medio |
|------|---------|-------------------------|------|-------------|
| | | 1 | 2 | |
| 1 | | 100 | 100 | 100 |
| 2 | | 66'6 | 73'3 | 70 |
| 3 | | 70 | 75'5 | 72'7 |
| 7 | | 80 | 88'8 | 84'4 |
| 15 | | 60 | 77'7 | 68'5 |
| 22 | | 40 | 33'3 | 36'6 |

HGMA liofilizado en presencia de solución Ca Cl₂ 0'05 M.

| Días | ensayos | % de actividad residual | | Valor medio |
|------|---------|-------------------------|------|-------------|
| | | 1 | 2 | |
| 1 | | 100 | 100 | 100 |
| 2 | | 80 | 88'9 | 84'4 |
| 3 | | 80 | 88'9 | 84'4 |
| 7 | | 90 | 88'9 | 89'4 |
| 15 | | 80 | 88'9 | 84'4 |
| 22 | | 88'9 | 73'3 | 81'1 |

HGMA liofilizado en presencia de solución buffer pH 5'7

| Días | ensayos | % de actividad residual | | Valor medio |
|------|---------|-------------------------|------|-------------|
| | | 1 | 2 | |
| 1 | | 100 | 100 | 100 |
| 2 | | 90'0 | 77'7 | 83'8 |
| 3 | | 84'0 | 77'7 | 80'8 |
| 7 | | 90'0 | 77'7 | 83'8 |
| 15 | | 50'0 | 62'2 | 56'1 |
| 22 | | 60'0 | 66'6 | 63'3 |

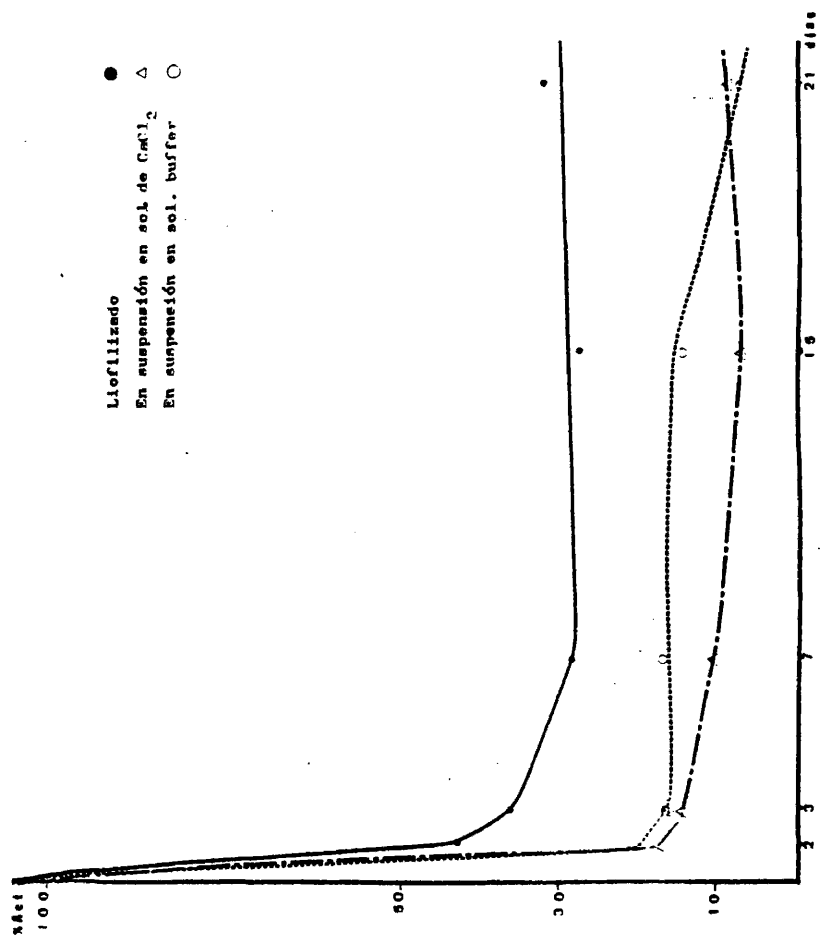


Fig. 17 Variación de la actividad del sistema H_2O_2 durante su conservación a temperatura ambiente.

Tabla XXI

A Temperatura ambiente
HGMA liofilizado en seco

| Días | % de actividad residual | | | Valor medio |
|------|-------------------------|------|------|-------------|
| | ensayos | 1 | 2 | |
| 1 | | 100 | 100 | 100 |
| 2 | | 43'3 | 43'3 | 43'3 |
| 3 | | 33'3 | 36'3 | 35'0 |
| 7 | | 26'6 | 30'0 | 28'3 |
| 15 | | 26'6 | 30'0 | 28'3 |
| 22 | | 33'3 | 33'3 | 33'3 |

HGMA liofilizado en presencia de solución $\text{Ca Cl}_2 0'05 \text{ M.}$

| Días | % de actividad residual | | | Valor medio |
|------|-------------------------|------|------|-------------|
| | ensayos | 1 | 2 | |
| 1 | | 100 | 100 | 100 |
| 2 | | 16'6 | 23'3 | 20 |
| 3 | | 16'6 | 16'6 | 16'6 |
| 7 | | 18 | 16'6 | 17'3 |
| 15 | | 16'6 | 13'3 | 15 |
| 22 | | 10 | 6'6 | 8'3 |

HGMA liofilizado en presencia de solución buffer a pH 5'7

| Días | % de actividad residual | | | Valor medio |
|------|-------------------------|------|------|-------------|
| | ensayos | 1 | 2 | |
| 1 | | 100 | 100 | 100 |
| 2 | | 16'6 | 16'6 | 16'6 |
| 3 | | 16'6 | 16'6 | 16'6 |
| 7 | | 10 | 11'3 | 10'6 |
| 15 | | 6'6 | 6'6 | 6'6 |
| 22 | | 10 | 10 | 10 |

Tabla XXII
Tabla resumen

En frigorífico

| Día | 1 | 2 | 3 | 7 | 15 | 22 |
|-------------------------------------|-----|------|------|------|------|------|
| Liofilizado seco | 100 | 70 | 72'7 | 84'4 | 68'5 | 36'6 |
| Solución Ca Cl ₂ 0'025 M | 100 | 84'5 | 84'5 | 89'4 | 84'5 | 81'1 |
| Solución buffer pH 5'7 | 100 | 88'8 | 80'8 | 83'8 | 56'1 | 63'3 |

A Temperatura ambiente

| | | | | | | |
|-------------------------------------|-----|------|------|------|------|------|
| Liofilizado seco | 100 | 43'3 | 35'0 | 28'3 | 28'3 | 33'3 |
| Solución Ca Cl ₂ 0'025 M | 100 | 16'6 | 16'6 | 10'6 | 6'6 | 10'0 |
| Solución buffer pH 5'7 | 100 | 20 | 16'6 | 17'3 | 15'0 | 8'3 |

Se recogieron sobrenadantes de los inmovilizados que estuvieron a temperatura ambiente, tanto los que estaban en presencia de una solución buffer de pH 6'7 como los que estaban en solución buffer del mismo pH pero en presencia de cloruro cálcico 0'025 M.

Las absorbancias debidas al proceso que transcurre a temperatura ambiente en presencia de la solución buffer, descontados los de la absorbancia debida a la estreptomycin, han sido: En el día 3º de la experiencia la absorbancia fué de 0'02 y en la 3ª semana 0'2.

Las absorbancias correspondientes al sistema que está en contacto con la solución de cloruro cálcico 0'025 M a la misma temperatura que la anterior fueron: En el día 3º la absorbancia fué de 0 y en la 3ª semana 0'13.

Estabilidad del sistema HGMA a la acción de sucesivos pases de sustratos.

Con esta experiencias pretendíamos ver la estabilidad del sistema inmovilizado HGMA a la acción de sucesivos pases de sustratos. Como en el caso de la ureasa inmovilizada, una vez que se acababa el tiempo de incubación, se extraía el producto de la reacción sin necesidad de desactivar ó desnaturalizar la enzima y así volverla a usar indefinidamente.

La naturaleza del sistema no nos permitió el empleo de una pequeña columna con el sistema HGMA en el interior, como en un reactor enzimático. Se siguió la técnica general. con 25 mg del sistema HGMA y la solución sustrato de trabajo, poniendo 4'5 ml de esta a pH 5'7 durante una hora de incubación; al finalizar el proceso se recogía el sobrenadante y se hacían en ellas las pruebas de actividad. El sistema se lavaba con 2 ml de solución buffer de trabajo de pH 5'7 y se le añadía un nuevo volumen de sustrato, repitiéndose el proceso cuatro veces. En este caso el 100% de actividad se ha dado a la actividad que tendría el sistema en el primer paso y con relación a ésta se expresaron las actividades de las demás. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla XXIII
% de actividad residual

| Pases | ensayos | 1 | 2 | 3 | Valor medio |
|-------|---------|------|------|------|-------------|
| 1 | | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 2 | | 45'2 | 60'8 | 55'5 | 53'8 |
| 3 | | 27'4 | 34'7 | 33'3 | 31'8 |
| 4 | | 11 | 17'4 | 11'1 | 13'1 |

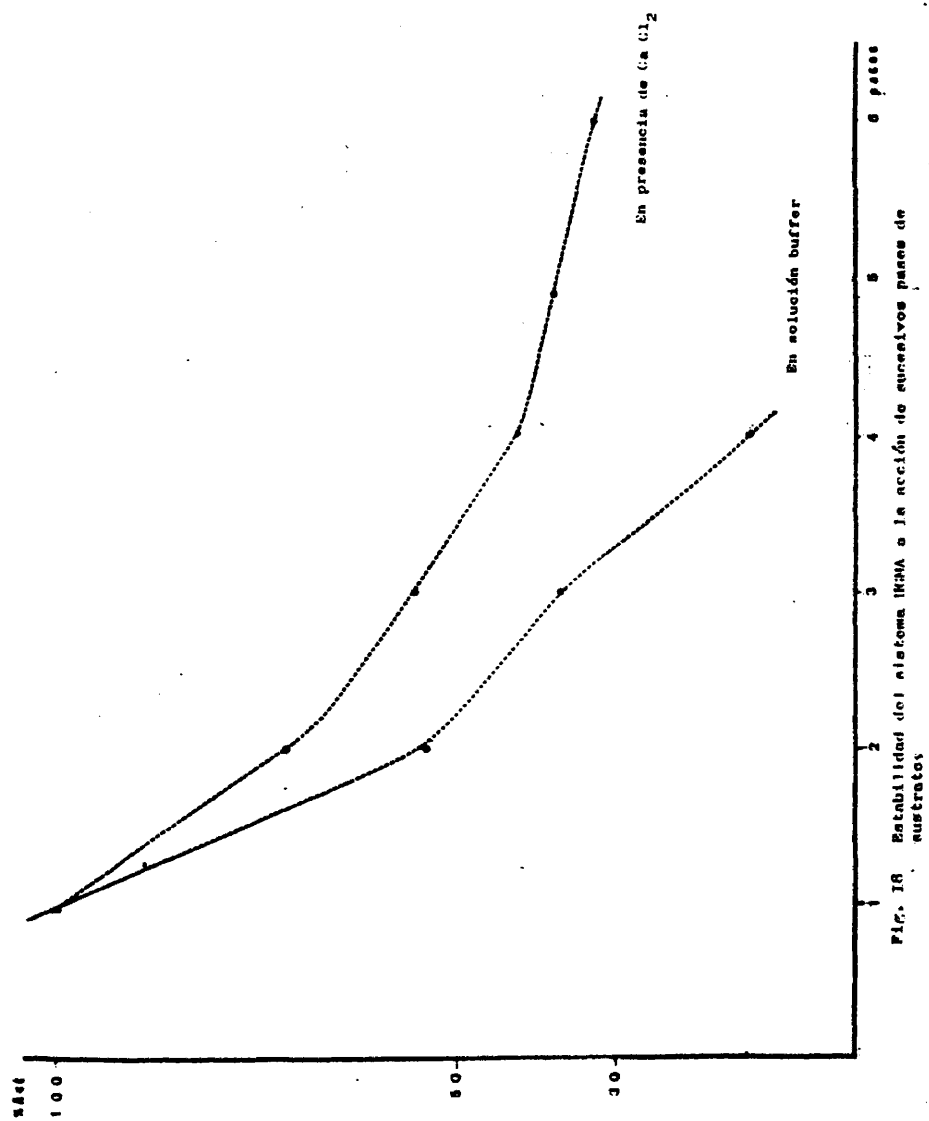


Fig. 18 Estabilidad del sistema INMA o la acción de sucesivos pases de sustratos

Posteriormente intentamos averiguar la estabilidad del sistema HGMA a la acción de los pases en presencia de un activador como es el cloruro de calcio ya que los dos iones Cl^- y el Ca^{2+} son activadores. Para ello se dispuso el sistema HGMA de la misma forma anteriormente descrita y la solución de sustrato de trabajo contenía cloruro cálcico (Ca Cl_2) de 0'025 M de concentración, haciéndosele pasar a continuación por el sistema inmovilizado siguiéndose la técnica anteriormente descrita. En este caso como en el anterior se ha dado el 100% de actividad a la que tendría el sistema en el primer pase de sustrato y con relación a éste la de los pases sucesivos.

Tabla XIV

| Pases | ensayos | % de actividad residual | | | Valor medio |
|-------|---------|-------------------------|------|------|-------------|
| | | 1 | 2 | 3 | |
| 1 | | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 2 | | 80 | 71'4 | 62'5 | 71'3 |
| 3 | | 48 | 57'1 | 62'5 | 55'9 |
| 4 | | 32 | 62'8 | 56 | 42'2 |
| 5 | | 32 | 42'8 | 37'5 | 37'4 |
| 6 | | 24 | 42'8 | 30 | 32'2 |

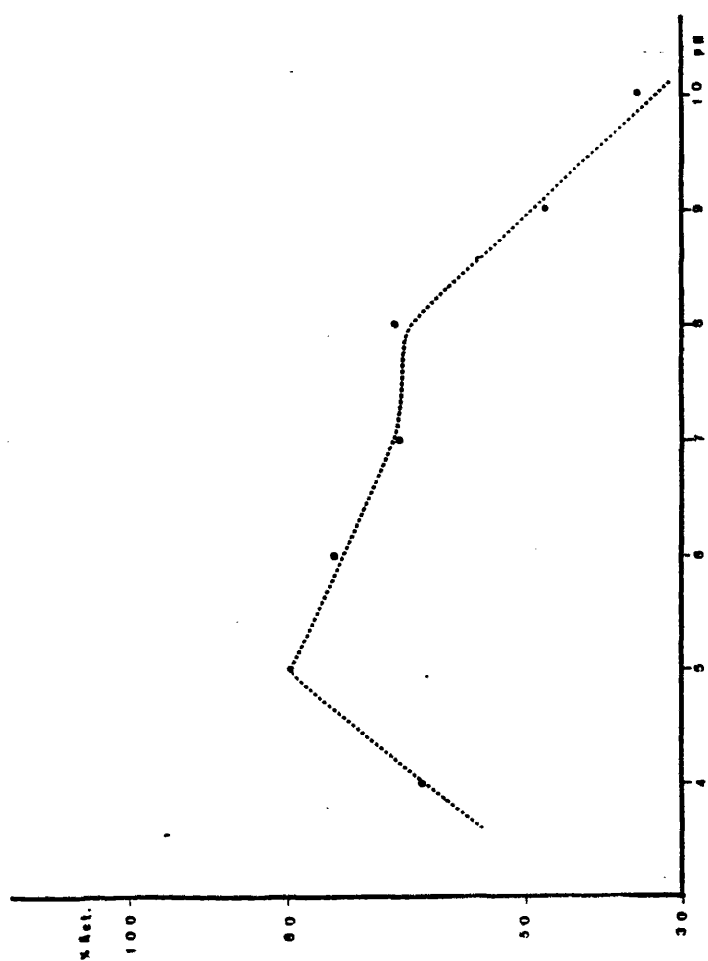


Fig. 19 Estabilidad del sistema H₂A a la acción de soluciones de diversos pH.

Estabilidad del sistema HGMA a la acción de solución a distintos pH y a diferentes temperaturas.

a) Estabilidad del sistema a distintos pH.

Se prepararon una serie de muestras de 25 mg, se le añadieron 5 ml de soluciones buffer de fosfatos de pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, manteniéndolas con agitación y a la temperatura ambiente durante tres horas. Pasado el tiempo se centrifugan los sistemas, recogiendo los sobrenadantes y a continuación a los sistemas de inmovilizado se le añadía la solución de sustrato, determinándose la actividad residual de cada uno de ellos, relacionándola con la del mismo sistema no sometido al tratamiento y al que se le da un valor relativo de 100% de actividad enzimática. Los resultados obtenidos se expresan a continuación.

Tabla XXV
% de actividad

| pH | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
|----|---------|------|------|-------------|
| 4 | | 64'6 | 61'5 | 63'05 |
| 5 | | 80 | 80 | 80 |
| 6 | | 73 | 73 | 73 |
| 7 | | 62'3 | 69 | 65'5 |
| 8 | | 69 | 65'6 | 67'3 |
| 9 | | 47 | 48'5 | 47'7 |
| 10 | | 33'6 | 36'5 | 35 |

b) Estabilidad del sistema HGMA respecto de la temperatura

Con esta experiencia intentamos conocer el efecto que podría tener la temperatura sobre el sistema HGMA. Para ello a 25 mg del sistema inmovilizado se le puso en contacto con 3 ml de la solución

buffer de fosfatos a pH 5'7, manteniéndolas durante una hora a distintas temperaturas 20, 30, 40 y 50°C con agitación. Se centrifugaron a continuación, retirando el sobrenadante. Con el sistema ya separado se medía su actividad residual aplicando la técnica general. A efectos de comparación, una solución de α -amilasa de trabajo en solución buffer de fosfatos de pH 5'7 se sometía a las mismas condiciones anteriormente expuestas determinando su actividad por el método general. El 100% de actividad se daba a los sistemas que no habían sido sometidos al tratamiento anterior. Los resultados obtenidos fueron los siguientes.

Tabla XXVI

Enzima % de actividad residual

soluble

| Temperatura | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
|-------------|---------|------|------|-------------|
| 20 | | 100 | 100 | 100 |
| 30 | | 88'9 | 66'6 | 77'7 |
| 40 | | 33'3 | 44'4 | 39'0 |
| 50 | | 0 | 11'1 | 5'5 |

Enzima

inmovilizada

| Temperatura | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
|-------------|---------|------|------|-------------|
| 20 | | 100 | 100 | 100 |
| 30 | | 88'9 | 72'7 | 80'8 |
| 40 | | 44'4 | 54'5 | 49'5 |
| 50 | | 33'3 | 27'2 | 30'3 |

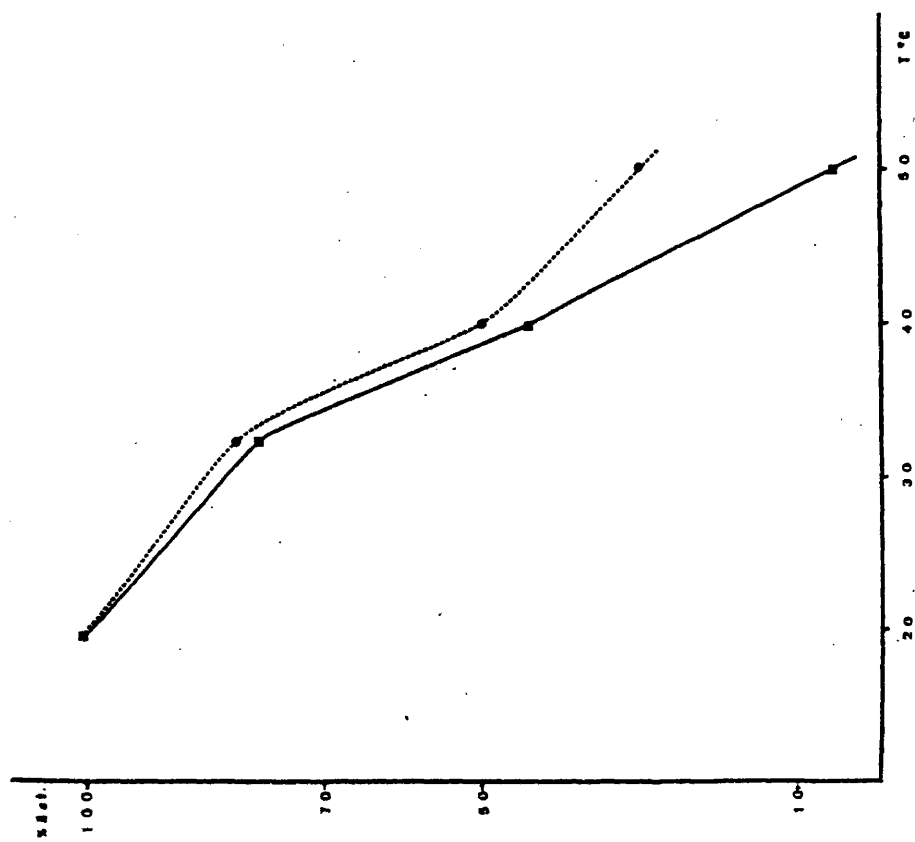


Fig. 20 Estabilidad de la (Lactosa) en solución de la temperatura.

Paralelamente a los sobrenadantes recogidos de las experiencias anteriores se les hicieron unos barridos de espectro entre las longitudes de onda de 200 y 400 nm. En el primer caso se observaron las variaciones de las absorbancias respecto al pH frente a un blanco que era la solución buffer correspondiente, se observó principalmente la región de los 280 nm.

Las absorbancias en esta región fueron las siguientes:

Tabla XXVII

| <u>pH</u> | <u>A . l = 280 nm.</u> |
|-----------|------------------------|
| 4 | 0'21 |
| 5 | 0'15 |
| 6 | 0'19 |
| 7 | 0'37 |
| 8 | 1'13 |
| 9 | 1'42 |
| 10 | 1'15 |

El sobrenadante correspondiente a la serie que estaba en contacto con la solución buffer a pH 10 tuvo que ser diluido al 50% con la solución buffer correspondiente.

En la segunda experiencia observamos las variaciones de las absorbancias respecto a las temperaturas frente a un blanco, que era la solución buffer de trabajo, observándose igualmente la región de los 280 nm. Al hacerles unos barridos de espectros entre 200 y 400 nm. Las absorbancias en la región anteriormente dicha fueron:

Tabla XXVIII

| <u>T°C</u> | <u>A $\lambda = 280 \text{ nm.}$</u> |
|------------|---|
| 30 | 0'58 |
| 40 | 0'69 |
| 50 | 1'26 |
| 60 | 1'35 |
| (1) 70 | 0'37 |

(1) El sobrenadante correspondiente a la serie que estuvo en contacto con la solución buffer a pH 5'7 a una temperatura de 70°C fué diluido al 1:4 con la solución buffer.

Determinación de la afinidad hacia el sustrato

Para su determinación se ha seguido el método gráfico de Lineweaver-Burk, representando los valores inversos a las velocidades de reacción y de las concentraciones de sustrato en ordenadas y abscisas respectivamente.

Al no poderse conocer el peso molecular del sustrato la concentración viene dado por 0'15, 0'3, 0'6, 0'9 y 1'2 g/100 ml. No se hicieron determinaciones con concentraciones superiores dada la pequeña solubilidad del sustrato. Los valores que se obtuvieron para condiciones de trabajo de pH 5'7 y temperatura de incubación de 37°C.

| | |
|----------------------|----------------|
| Amilasa soluble | 0'317 g/100 ml |
| Amilasa inmovilizada | 0'183 g/100 ml |

K_m E. inmovilizada
 0,183 g / 100 ml.
 K_m E. soluble
 0,217 g / 100 ml.

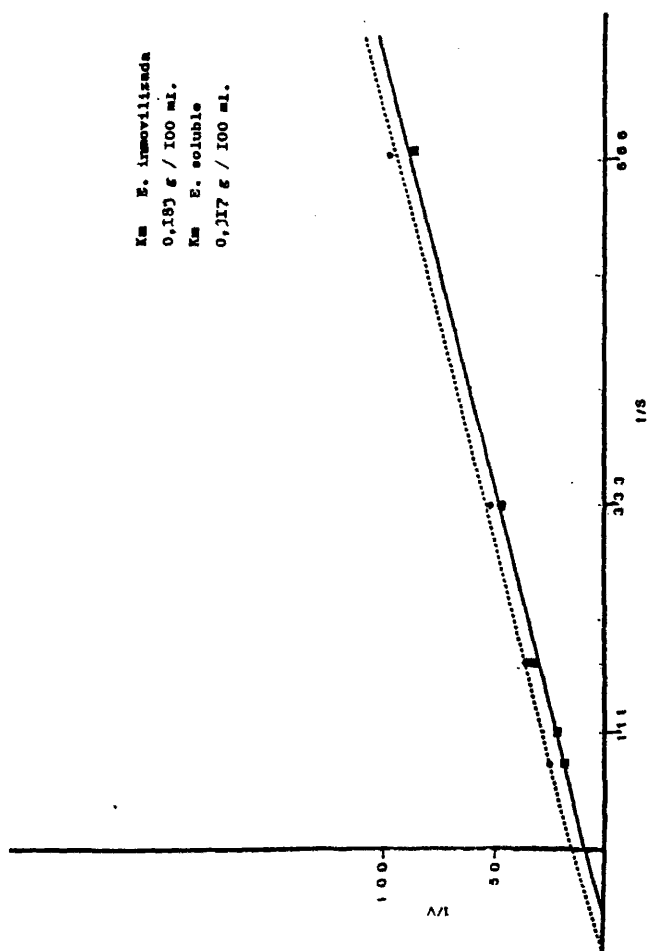


Fig. 21 Determinación de la afinidad de la α amilasa al sustrato.

Comportamiento de los sistemas HG, HGM, HGMU y HGMA.

Con objeto de disponer del mayor número de datos que nos permitan conocer las características de las membranas de los hematíes en cada uno de los sistemas se sometieron a las tinciones usuales de May-Brunwal-Giemsa, Papanicolau, Gram y Negro Sudán.

El comportamiento de las dos primeras técnicas es concordante, ya que de las coloraciones que toman los hematíes Figs. 22 - 23. Los del sistema HG tienen características acidófilas, mientras que las de los sistemas HGM, HGMU y HGMA se manifiestan como basófilos en mayor ó menor grado.

Frente al Gram también se aprecian diferencias de comportamiento bien manifiestas entre los hematíes del sistema HG y las de los demás Fig. 24-25. Las del sistema HG se comportan como Gram positivos mientras que las de los sistemas HGM, HGMU y HGMA son aparentemente Gram negativos.

Como quiera que esta técnica de tinción, nos pone de manifiesto diferencias de comportamiento en cuanto a la permeabilidad de las membranas se refiere, resulta evidente que el enlace de la lectina al hematíe, aún cuando aparentemente es superficial, lleva consigo una profunda variación en la estructura de la membrana que la hace más permeable al complejo de cristal de violeta-I-IK.

La tinción con Negro Sudán B permite establecer diferencias entre los sistemas HG y HGM, que se comportan aparentemente como Sudán positivos, y los sistemas HGMU y HGMA que se tiñen de color azul más intenso en el caso del sistema con ureasa inmovilizada. Estas dife-

rencias son más manifiestas por visión directa que por microfotografía Fig. 13-36 tal vez por dificultades de la toma fotográfica ó por no haberse utilizado la película con sensibilidad adecuada.

Tinción May-Grünwald-Giemsa.

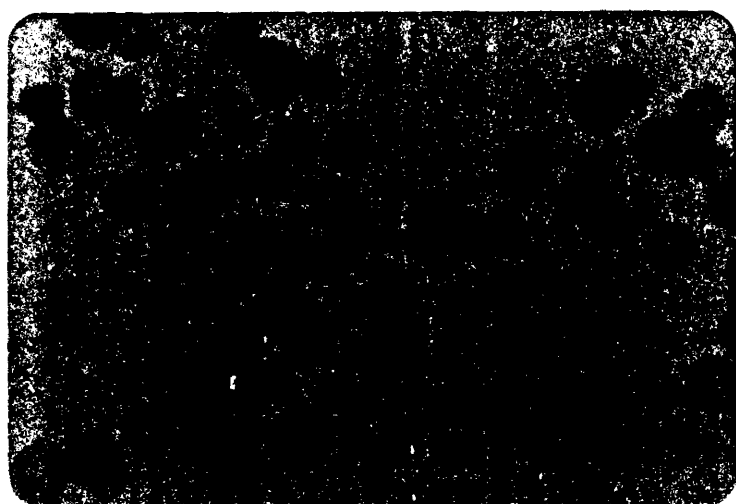


Fig. (22) Sistema HG. Tinción May-Grünwald-Giemsa.

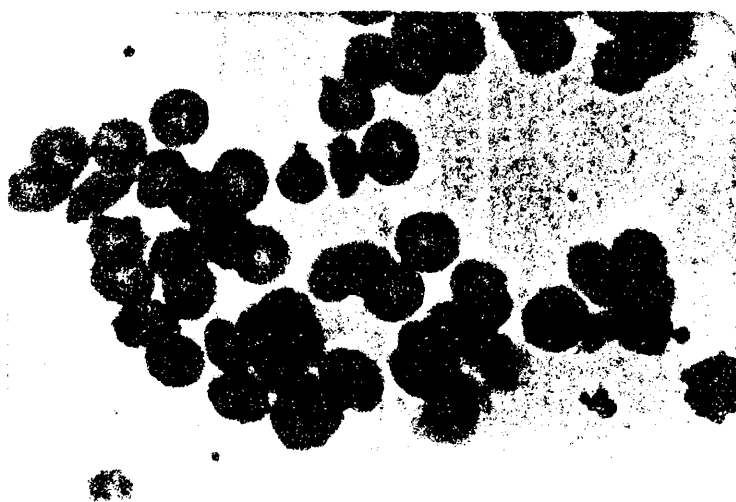


Fig. (23) Sistema HGM. Tinción May-Grünwald-Giemsa.

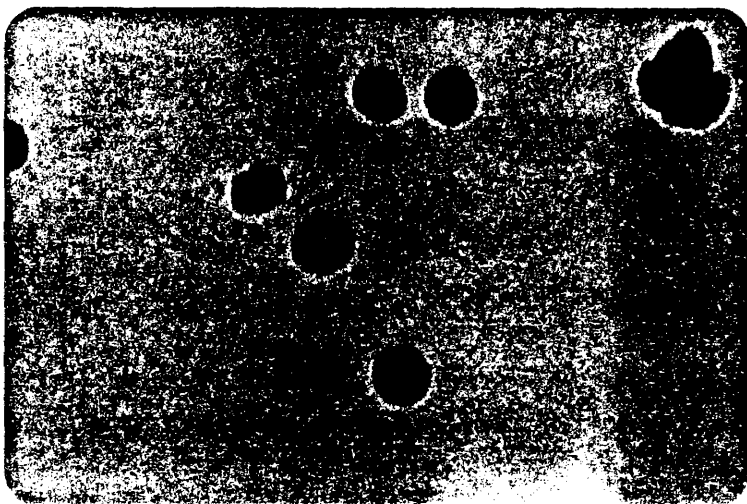


Fig (24) Sistema HCMU. Tinción May-Grunwald-Giemsa.

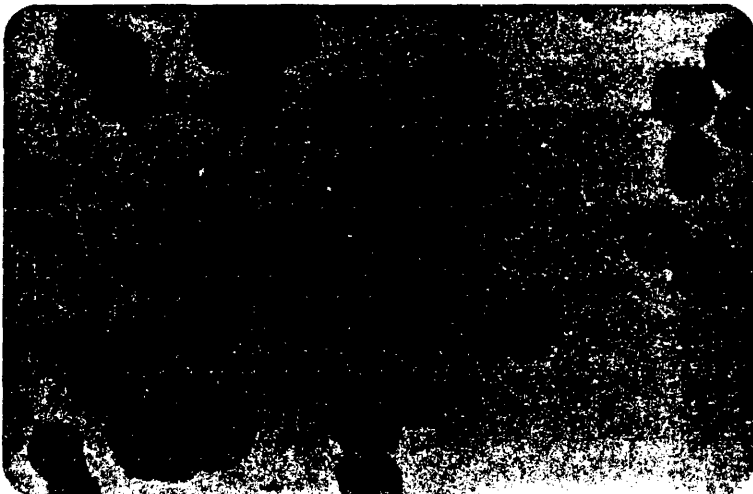
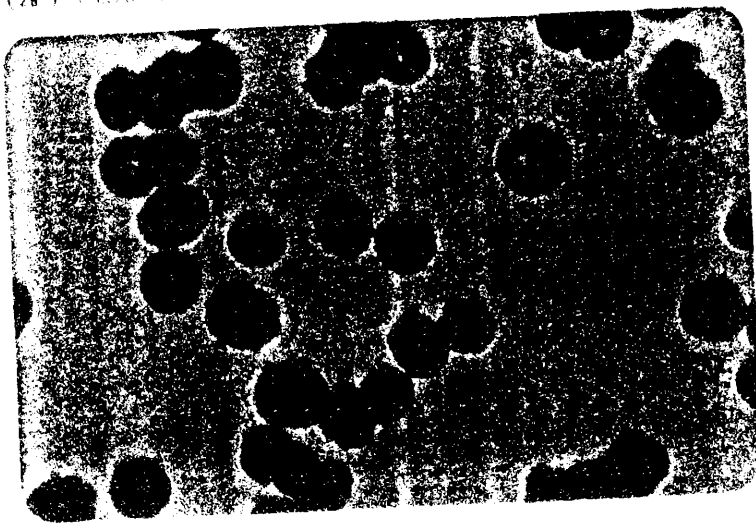


Fig (25) Sistema HCMA. Tinción May-Grunwald-Giemsa.

Tinción de Papanicolaou.

Fig (28) Sistema HG. Tinción Papanicolaou.



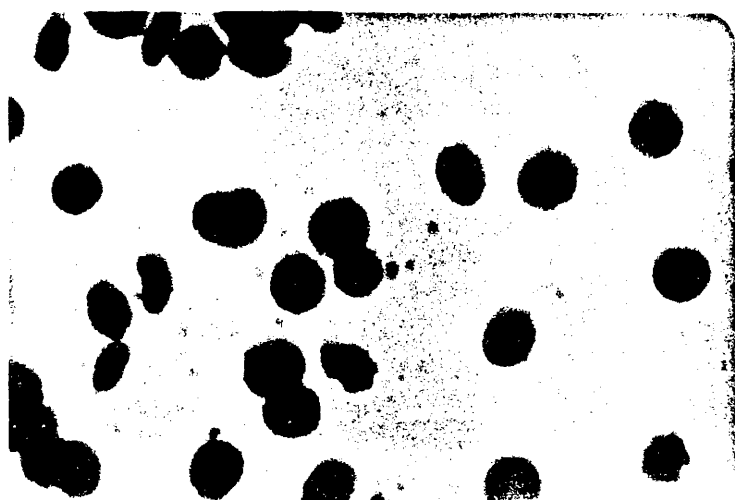


Fig (27) Sistema HGM. Tinción de Papanicolaou.

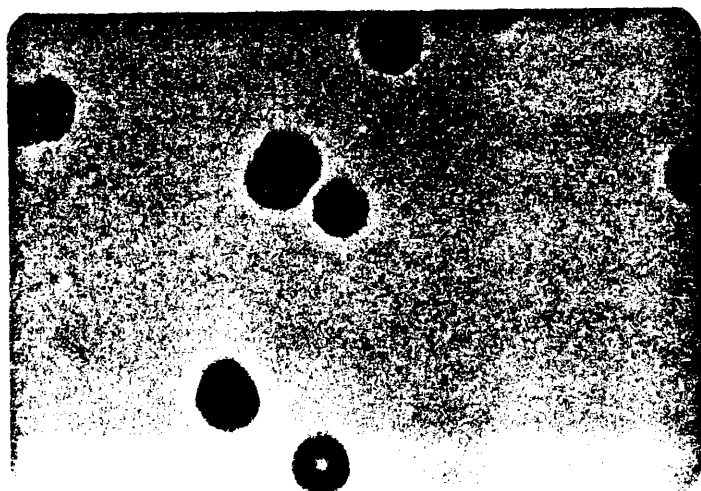


Fig (28). Sistema HGMU. Tinción de Papanicolaou.

Tinción Gram.



Fig (23) Sistema HG, Tinción Gram.



Fig (34) Sistema HGM, Tinción Gram.

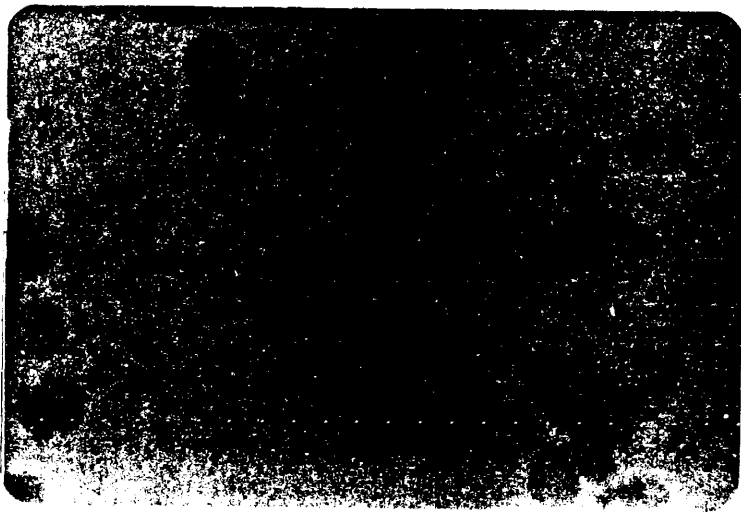


Fig (31) Sistema HGMU. Tinción Gram.

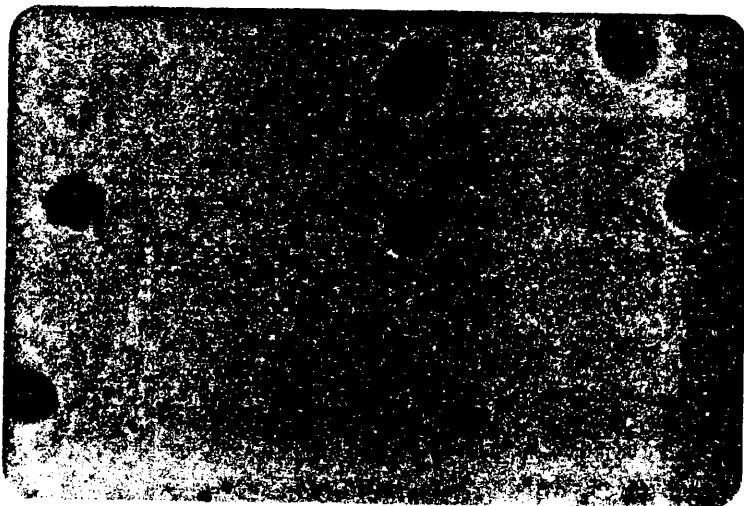


Fig (32) Sistema HGMA. Tinción Gram.

Tinción de Sudán

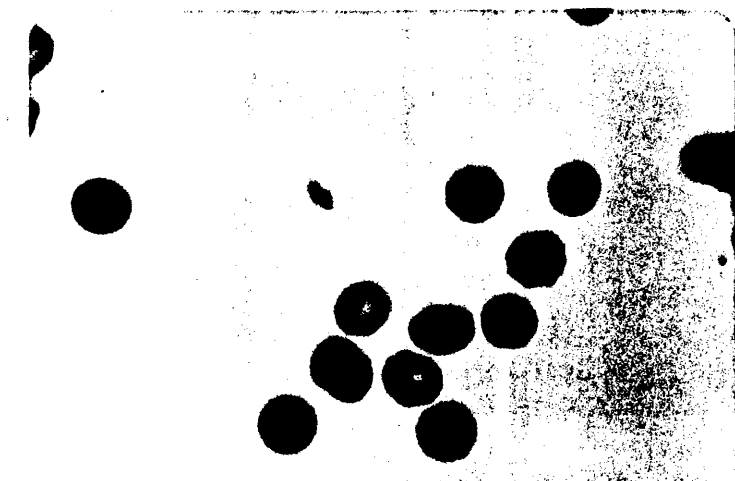


Fig (33) Sistema HG. Tinción de Sudán.

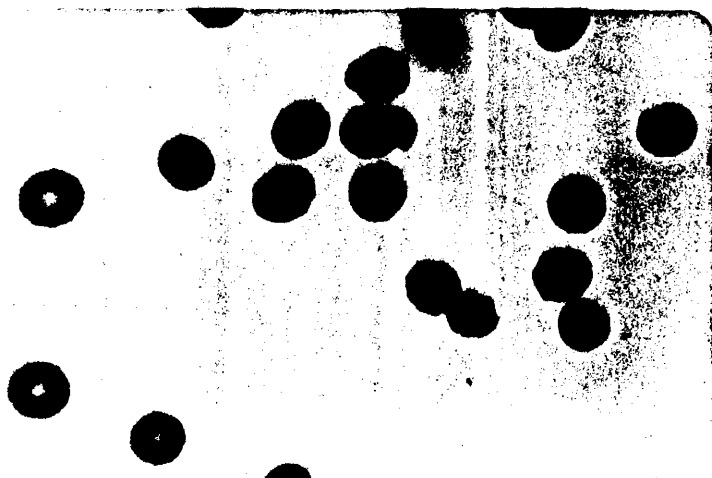


Fig (34). Sistema HGM. Tinción de Sudán.

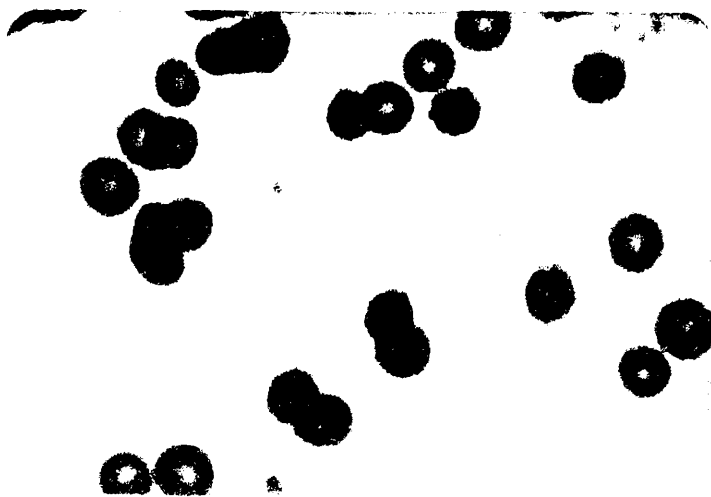


Fig (35). Sistema HGMU. Tinción de Sudán.

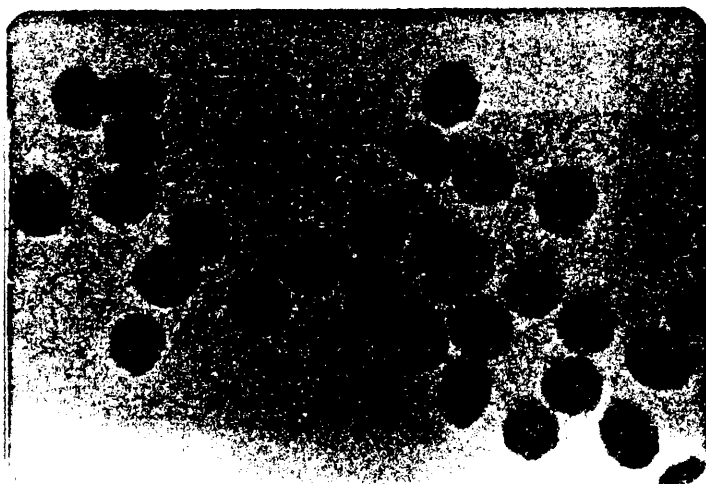


Fig (36). Sistema HGMA. Tinción de Sudán.

Como enzima proteolítica tipo para estudiar su posible inmovilización, se tomó la pepsina, suministrada por la casa Merck, con la que se ensayó primeramente la existencia de interacción con el extracto de Myrtus.

En buffer de Mc Ilvaine de pH 5 se disolvió la pepsina a una concentración del 1% (p/v), y el extracto de Myrtus al 2'5% (p/v). La adición de la solución del extracto a la de pepsina originaba la formación de un precipitado fácilmente separable por centrifugación.

Una estimación aproximada de la equivalencia pepsina extracto de Myrtus nos dió un valor de 10 a 4. Demostrada la interacción, el paso siguiente fué comprobar si la pepsina así insolubilizada conservaba su actividad enzimática. Para ello el precipitado se lavó repetidas veces con solución de HCl de pH 2 hasta que las soluciones de lavado no daban absorbancia a 280 nm. Este precipitado se desecaba en vacío y le denominaremos PM. Para determinación de la actividad enzimática se ha seguido la técnica propuesta por Hunl (125) que utiliza como sustrato una solución de un suero humano desecado y como reactivo para la valoración de los productos de hidrólisis el reactivo de Folin-Ciocalteu. Esquemáticamente el proceso se realizaba como sigue:

A 5 ml de sustrato (solución de 5'6 g de suero liofilizado en 100 ml de HCl pH 2'1 con ajuste final a este mismo pH) se le añaden los miligramos del sistema PM, y se incubaba, con agitación, a 37°C durante quince minutos; en este momento se le añaden 10 ml de solución de ácido tricloroacético 0'35 N previamente calentado a 37°C y se mantenía la incubación igualmente con agitación por cuatro minutos adicionales. Se filtra a continuación, y a los veinticinco minutos de iniciada la misma, se toman 2 ml de filtrado a los que se añaden sucesivamente 20 ml de NaOH 0'25 N y 1 ml del reactivo

de Folin-Ciocalteu. El color azul desarrollado se lee a 680 nm. frente a un blanco preparado de forma idéntica a la anterior pero omitiendo la adición del sistema PM.

Dada la manifiesta actividad presentada por el sistema PM, se operó con él de la forma habitual para los otros sistemas ya estudiados al objeto de conocer las condiciones óptimas para una mayor actividad y estabilidad del sistema.

Actividad a pH diferente

Se operaba con 1 mg del sistema PM y 5 ml del sustrato a pH diferentes en buffer de Mc Ilvaine. La Tabla siguiente nos representa los resultados obtenidos que, como ya es habitual, se considera valor 100% al que corresponda la máxima actividad.

Tabla XXIX

% actividad pepsina soluble

| pH | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
|----|---------|------|------|-------------|
| 1 | | 62 | 58 | 60 |
| 2 | | 100 | 100 | 100 |
| 3 | | 75 | 70 | 72'5 |
| 4 | | 42 | 39 | 40'5 |
| 5 | | 28'5 | 30'5 | 29'5 |

% actividad sistema PM.

| pH | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
|----|---------|------|------|-------------|
| 1 | | 40,6 | 40,6 | 40,6 |
| 2 | | 100 | 100 | 100 |
| 3 | | 53'1 | 59'1 | 56'2 |
| 4 | | 18'8 | 18'8 | 18'8 |
| 5 | | 9'4 | 9'4 | 9'4 |

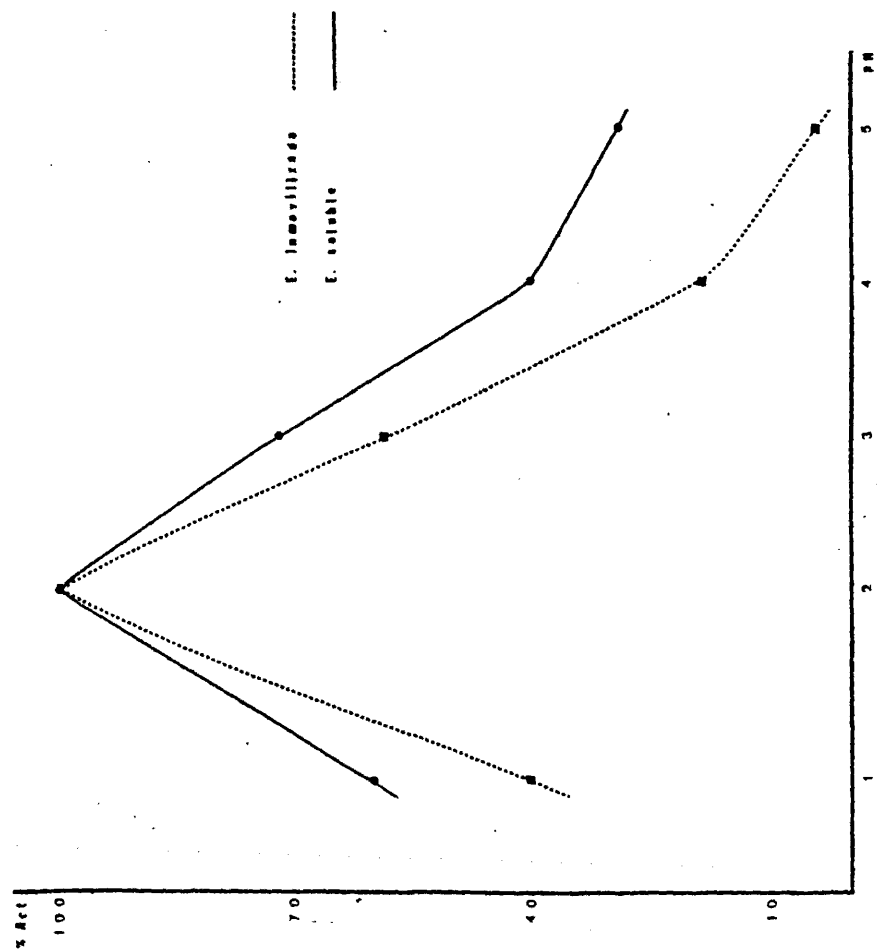


Fig. 37 Variación de la actividad de la pepsina al modificar el pH de incubación.

La máxima actividad se mantiene al pH 2 en el sistema PM, aún cuando se acusan mayores porcentajes de variación en la actividad a medida que nos alejamos del pH 2, en comparación con la pepsina en solución.

Actividad y temperatura

Para conocer el efecto de la temperatura se opera con el sistema PM y la enzima en solución a pH 2'1 y a temperaturas entre 20 y 70°C. A mayor temperatura se producía, como era de esperar, la coagulación del sustrato. La Tabla siguiente nos muestra los resultados obtenidos en ensayos repetidos:

Tabla XX

| Temperatura °C | % actividad pepsina soluble | | | |
|-------------------|-----------------------------|------|------|-------------|
| | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
| 20 | | 9 | 11 | 10 |
| 30 | | 19'5 | 19'5 | 19'5 |
| 40 | | 45'6 | 48 | 46'8 |
| 50 | | 68'7 | 79'4 | 74 |
| 60 | | 100 | 100 | 100 |
| 70 | | 76'6 | 88'8 | 82'7 |

| Temperatura °C | % actividad sistema PM | | | |
|-------------------|------------------------|------|------|-------------|
| | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
| 20 | | 5'1 | 9'2 | 7'1 |
| 30 | | 17'5 | 15'3 | 16'4 |
| 40 | | 33'8 | 32'8 | 33'3 |
| 50 | | 58'5 | 55'4 | 56'9 |
| 60 | | 93'4 | 97'5 | 95'4 |
| 70 | | 100 | 100 | 100 |

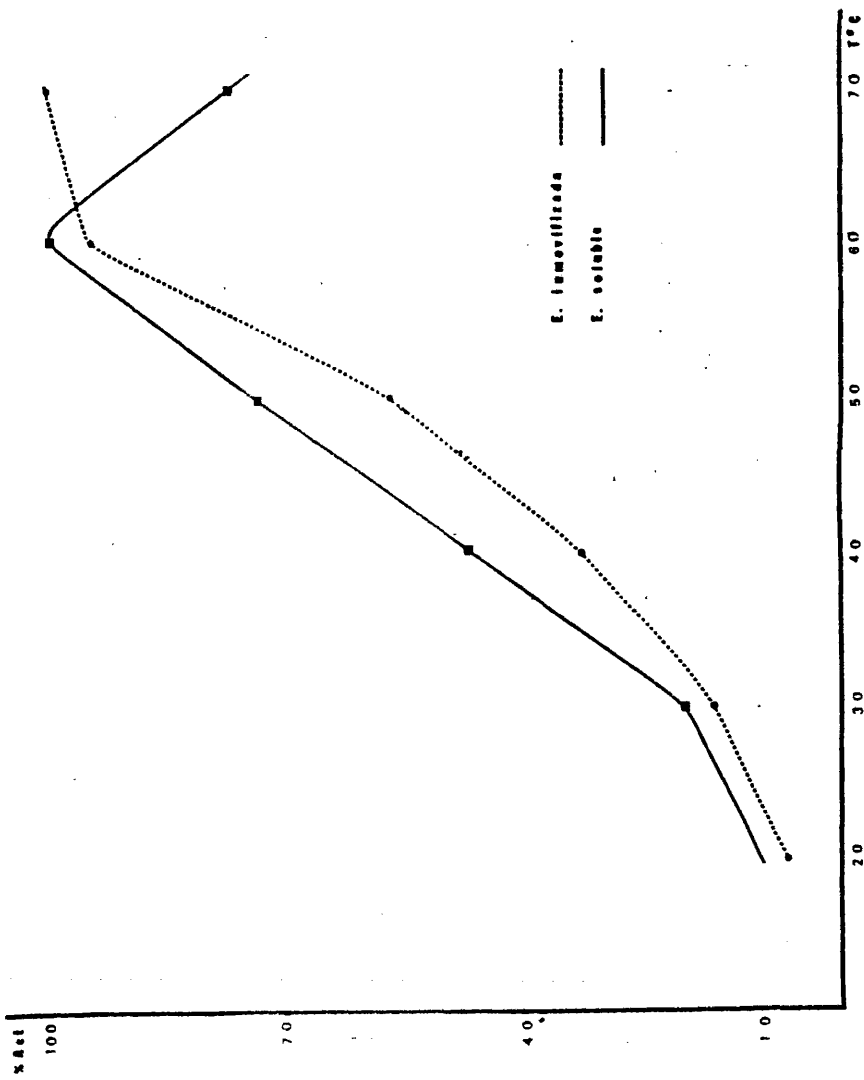


Fig. 18 Variación de la actividad de la pepsina al modificar la temperatura de incubación.

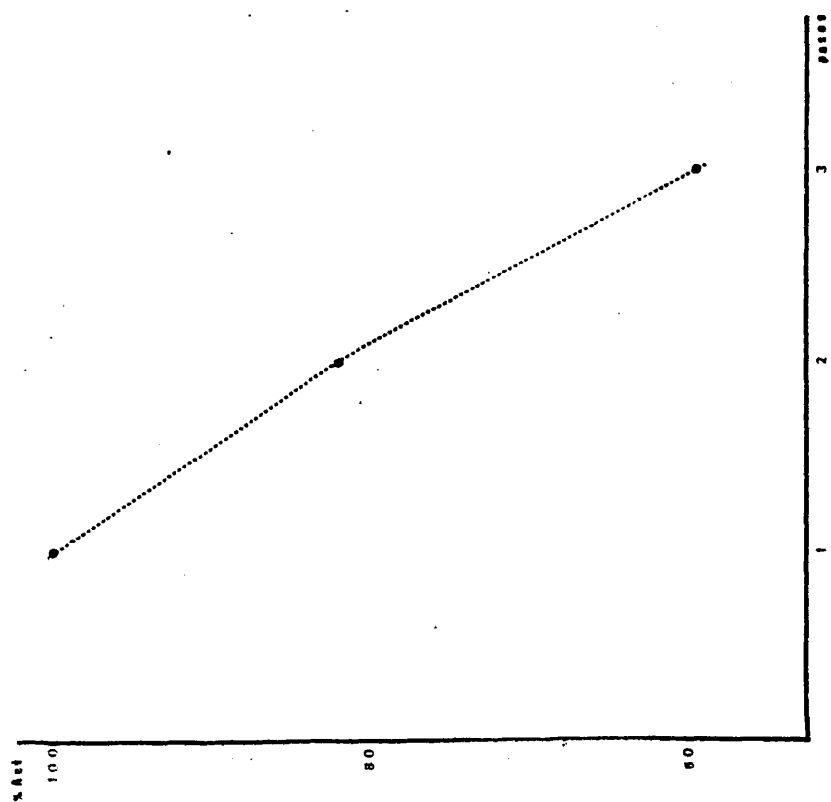


Fig. 38. Actividad del sistema IV a lo ucción de pesos sucesivos de muestras.

De la comparación de estos resultados parece desprenderse la posibilidad de una mayor termoestabilidad del sistema inmovilizado, pues a 70°C no se acusa un descenso de actividad de la pepsina en solución, sino todo lo contrario, ya que es ligeramente superior que presenta a 60°C.

Actividad frente a sustratos sucesivos.

El estudio de la estabilidad de los sistemas inmovilizados en traña grandes dificultades, como ya hemos tenido ocasión de comprobar pues requiere la recogida del sistema por centrifugación tras actuar sobre el sustrato, con lavados con la solución HCl de pH 2'1, antes de ponerlo otra vez en contacto con un nuevo volumen de sustrato.

La Tabla siguiente refleja los resultados obtenidos en ensayos por duplicado para la acción sucesiva de tres porciones del sustrato. Aquí la actividad 100% se le asigna a la que presenta frente al primer sustrato, midiendo en los ensayos subsiguientes la actividad residual del sistema PM.

Tabla XXI

| Pasos | % actividad | | | |
|-------|-------------|------|------|-------------|
| | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
| 1 | | 100 | 100 | 100 |
| 2 | | 82'3 | 81'9 | 82'1 |
| 3 | | 62'7 | 57 | 59'8 |

Estabilidad del sistema PM frente a pH y temperatura

Para conocer la estabilidad del sistema PM ante condiciones adversas de pH y temperatura, se hicieron ensayos manteniendo el siste

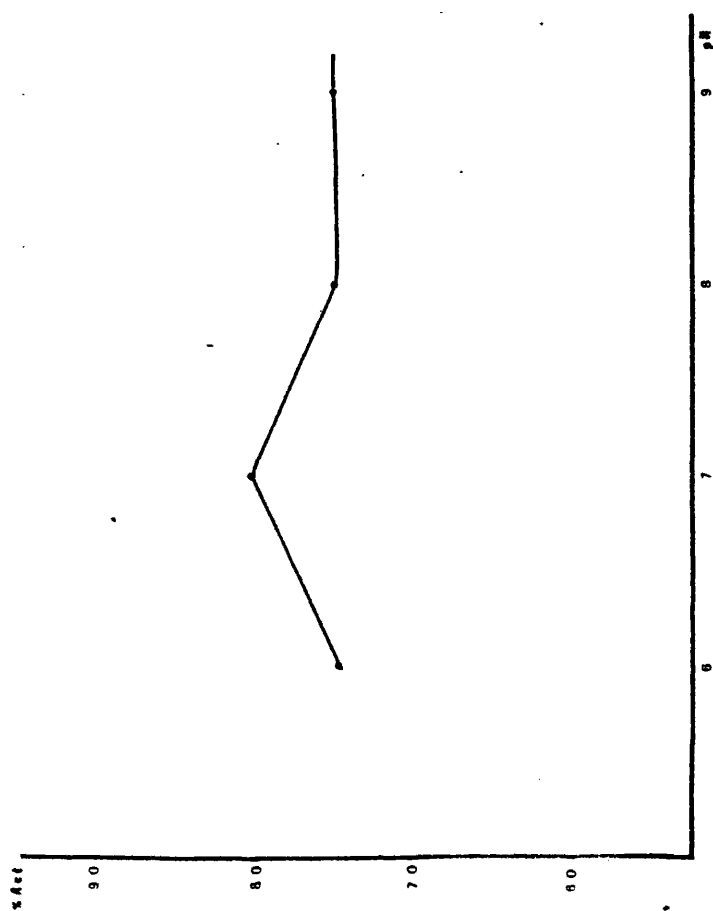


Fig. 40 Estabilidad del sistema PN a la acción de soluciones de diversos pH.

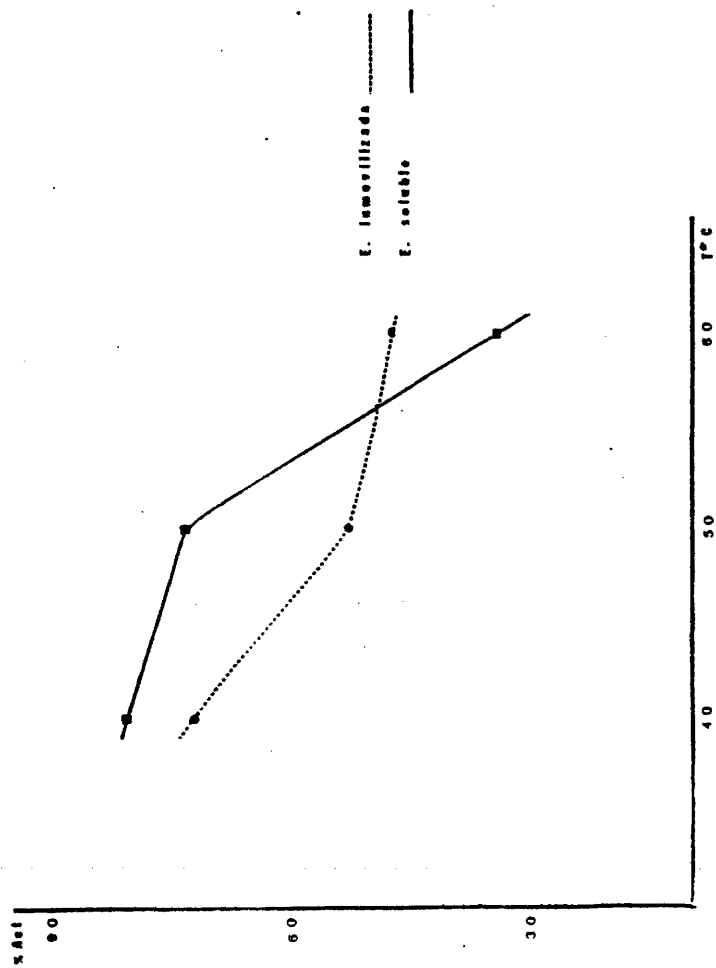


Fig. 41 Estabilidad de la papaína a la acción de la temperatura.

ma PM durante veintidos horas a 30°C en buffer de pH 6, 7, 8 y 9, con objeto de conocer la influencia del pH. Al cabo de este tiempo el sistema se centrifugaba y se ensayaba su actividad enzimática residual frente a la que tenía el sistema no sometido a este tratamiento.

Para conocer el efecto de la temperatura el sistema se suspendía en HCl de pH 2'1 y se mantenía a temperaturas entre 40 y 80°C por tiempos variables. Las veintidos horas del ensayo de pH resultaron excesivas, sobre todo a temperaturas de 60° y superiores, en que las pérdidas de actividad eran totales. Hubo necesidad de reducir el tiempo de contacto a 2'5 horas y el margen de temperatura a 40° - 60° para poder disponer de resultados comparativos.

En todos los casos, los líquidos sobrenadantes de estos ensayos se recogían para efectuar su espectro ultravioleta entre 200 y 500 nm.

Las Tablas XXII y XXIII nos muestran los resultados obtenidos.

Tabla XXII

% actividad residual sistema PM.

| pH | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
|----|---------|------|------|-------------|
| 6 | | 77'7 | 72'2 | 74'9 |
| 7 | | 77'7 | 83'3 | 80'5 |
| 8 | | 75 | 75 | 75 |
| 9 | | 77'7 | 72'2 | 74'9 |

Tabla XXIII

% actividad residual sistema PM.

| Temperatura | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
|-------------|---------|------|------|-------------|
| °C | | | | |
| 40 | | 72'5 | 70'5 | 71'5 |
| 50 | | 52'9 | 52'9 | 52'9 |
| 60 | | 47 | 47 | 47 |

| Temperatura °C | % actividad residual pepsina soluble | | | |
|-------------------|--------------------------------------|------|------|-------------|
| | ensayos | 1 | 2 | Valor medio |
| 40 | | 81'8 | 80 | 80'9 |
| 50 | | 72'7 | 74'5 | 73'6 |
| 60 | | 34'5 | 34'5 | 34'5 |

Por lo que respecta al efecto de la temperatura parece confirmar se lo que apuntamos anteriormente de una mayor termoestabilidad del sistema PM a altas temperaturas.

En cuanto al pH prácticamente no se acusan diferencias entre 6 y 9 a pesar de que las absorbancias de los sobrenadantes a 280 nm sí que muestran diferencias, lo que parece ser demostrativo de que aquello que se está disolviendo no debe corresponder a la enzima ya que el sistema mantiene su actividad alrededor del 75%. La Tabla siguiente nos muestra lo que se acaba de indicar.

Tabla XXIV

| pH | Dilución sobrenadante | Absorbancia |
|----|-----------------------|-------------|
| 6 | 1:2 | 0'65 |
| 7 | 1:2 | 0'5 |
| 8 | 1:2 | 0'5 |
| 9 | 1:3 | 0'5 |

En los sobrenadantes de los ensayos de temperatura por su parte, es posible detectar actividad aglutinante a títulos 1/2 y 1/8, demostrativo de la ruptura del sistema PM y que están de acuerdo con la fuerte pérdida de actividad a temperaturas superiores a 50°C.

Las medidas de actividad enzimática realizadas con pepsina soluble, a efectos de comparación, se hicieron siguiendo la misma técnica, sustituyendo el sistema PM, por 0'5 ml de una solución de pepsina en HCl de pH 2'1 a una concentración de 1 mg por ml.

Inmovilización sobre soportes

Se ha intentado inmovilizar la pepsina sobre el sistema de hematíes HCM, pero se ha podido demostrar que ello no es posible. Al poner en contacto el sistema HCM con una solución de pepsina de pH 5 se observa una progresiva coloración de la solución achacable a la acción de la enzima sobre el propio soporte con degradación de éste; demostrable por la prueba de Lowry (128) que nos pone de manifiesto la presencia de productos de degradación proteica. La prueba resultaba negativa para el sistema HCM y la solución de pH 5 en ausencia de pepsina.

Lo mismo ocurría cuando se intentó la inmovilización sobre un soporte a base del producto de condensación hemoglobina humana-glutaraldehído, un producto geliforme que puede desecarse y que permite la fijación de la lectina del extracto de mirto. En contacto con la solución de pepsina ésta se colorea y el espectro ultravioleta de estos sobrenadantes en función del tiempo de contacto a temperatura ambiente, nos muestra una banda muy marcada entre 310-330 nm. que aumenta con el tiempo. Este espectro es muy semejante al que se observaba en los estudios previos de la estabilidad del soporte hematíe-glutaraldehído (HG) y que debe de corresponder a la hemoglobina modificada por el glutaraldehído.

DISCUSION DE RESULTADOS

La tesis mantenida es establecer un sistema de enzimas inmovilizadas en base a la preparación de un soporte inerte, los hematíes fijados con glutaraldehído (HG) y un elemento que sirva de puente entre el soporte y la enzima, la lectina de las semillas del *Myrtus Communis*.

Interesaba por tanto conocer, como base de partida, la estabilidad del soporte HG frente a los medios y condiciones experimentales en que tiene que verse durante los procesos de inmovilización y de actuación sobre los sustratos de trabajo, concretamente a la acción de diferentes pH.

La figura 1 es demostrativa de que tres horas de permanencia del sistema HG a temperatura ambiente, no altera aparentemente la naturaleza del mismo, ya que los sobrenadantes muestran muy débil absorbancia entre 250 y 800 nm., indicativo de que apenas si ha existido redisolución de componentes del sistema de hematíes. La banda de adsorción que va apareciendo entre 300 y 340 nm. al acidificarse el medio podría corresponder a algún producto de transformación de la hemoglobina formado durante el proceso de fijación del hematíe con el glutaraldehído, posiblemente hematina ó metahemoglobina.

La fijación de la lectina al sistema HG es un proceso relativamente rápido ya que bastan diez minutos para conseguir el máximo de fijación. Este proceso es pH dependiente pues a pH 4 se consigue unir un 40% más de lectina que a pH 7. Tal comportamiento era posible ya que en trabajos anteriores (100) se había demostrado que las interacciones de la lectina en solución con los componentes proteicos del suero humano, la formación de precipitados era más efectiva a pH 4 que a cualquier pH. Se saca pues ventaja de utilizar



pH para la inmovilización, aún cuando puede extenderse la zona de trabajo entre los pH 2 y 5.

Al repetir ahora los ensayos de estabilidad del nuevo sistema HGM a las soluciones de pH de 4 a 9, nos encontramos con más absor**ban**cias de los sobrenadantes a 280 nm. que comienzan a ser signifi**cat**ivas a partir del pH 7, duplicándose la adsorbancia en la soluc**ión** a pH 8 y haciéndose cuatro veces mayor en la de pH 9. El to**mar** como indicador la adsorbancia a 280 nm. es debido a que la lec**ti**na responsable de la aglutinación de los hematíes absorbe a dicha longitud de onda; luego puede pensarse que aunque débilmente algo de lectina puede estar redisolviéndose a estos pH. Llama sin embar**go** la atención este hecho, ya que antes de someter a la liofiliza**ción** el sistema HGM se lavaban los hematíes hasta ausencia de ab**sor**bancia a 280 nm; luego la causa de que a posteriori se redisuel**van** pequeñas porciones de la lectina habrá que buscarla en el pro**ceso** de liofilización ó el previo de congelación, que bien disminu**ye** la fuerza del enlace lectina-hematíe ó dejan al descubierto zo**nas** superficiales que no eran accesibles a los líquidos de lavados. No cabe duda que el proceso combinado de congelación y liofiliza**ción** puede abrir grietas en la membrana del hematíe fijado y dejar al descubierto nuevas zonas superficiales, pero el hecho de que el proceso es pH dependiente aboga por una acción de redisolución más específica y no por un simple mecanismo de lavado.

De cualquier forma este fenómeno no nos invalida al sistema HGM para su utilización como soporte de las enzimas, ya que la pér**di**da de lectina en todo caso es pequeña y además, la unión de la en**zi**ma nos estabiliza al sistema HGM como se puede comprobar con la ureasa inmovilizada, HGMU que no tiene pérdida aparente de actividad en los ensayos paralelos, antes de liofilizarlos y una vez liofili**zados**. Los aumentos de temperaturas en el sistema HGM suspendida en

buffer de pH 6'7, pueden provocar la redisolución parcial de la leg^umina, sobre todo a temperaturas superiores a los 50°C. Este mismo fenómeno sería también detectable con el sistema inmovilizado con el sistema HGMU.

Comprobada la efectividad del sistema de hematíes fijados por glutaraldehído y saturados con los componentes del extracto de semillas de *Myrtus communis*(HGM) para inmovilizar a la ureasa, fenómeno éste que resulta ser dependiente del pH, con un máximo de efectividad al valor de 6.

Es sabido que de manera general, la inmovilización de una enzima lleva consigo una pérdida de su actividad, cosa que también está ocurriendo en nuestro sistema HGMU. Ya hemos comentado las dificultades que se presentan para conocer con exactitud la ureasa que queda unida por mg de soporte, debido a que en la preparación del sistema final de trabajo, se verifican no menos de seis lavados con solución buffer y un proceso final de liofilización.

Las medidas realizadas nos muestran que la pérdida de actividad en los lavados es del orden del 50%, gran parte de ella debido a la solubilización de ureasa debilmente unida al soporte. En la liofilización, sin embargo, no se ha apreciado variación aparente en la actividad.

Esta pérdida de actividad no creemos inválida el proceso, ya que tan fuerte, ó superiores, son las pérdidas que sufren otras enzimas en soportes semejantes como, por ejemplo la uricase inmovili^zada en albúmina por intermedio de glutaraldehído, que pierde en el proceso un 60% de su actividad,(127), ó la β -glucuronidasa incorporada a hematíes por la técnica del intercambio hipotónico, que

solo lo hace en una cuantía del 4'4% del original(128)

El estudio del pH óptimo para la ureasa inmovilizada nos ha proporcionado dos datos de interés: el primero, que la actividad máxima se desplazará respecto a la ureasa soluble del pH 8-9, al pH 7, lo cual no deja de ser una gran ventaja con vistas a una posible utilización "in vitro" del sistema de estudio, y el segundo que a pH 5 presenta una actividad apreciable en contraste con la ureasa soluble al coincidir con su punto isoeléctrico.

Este cambio del máximo de actividad a pH inferiores, se interpreta por una modificación del microentorno de los grupos activos de la ureasa, como consecuencia a su fijación sobre el soporte HGM. En este caso cabe suponer que los centros activos de la ureasa en HGMU, están detectando un microentorno más básico que el correspondiente a la solución buffer en la que se encuentra.

En la temperatura de incubación también se encuentran diferencias entre la ureasa soluble y el sistema HGMU, favorables también a este último.

En la ureasa soluble, la temperatura óptima para un máximo de actividad se sitúa en los 60°C, con una disminución patente al descender la temperatura, llegando a ser del 52% inferior a los 30°C. Para el sistema HGMU el máximo de la actividad se obtiene a 70°C, aunque este resultado deberá ser sometido a revisión pues al simple fenómeno de incubación se le puede estar añadiendo un proceso de liberación de la enzima con un aumento de la actividad una vez disuelta, fenómeno éste que se ha podido comprobar en los ensayos de resistencia a los agentes exteriores, temperaturas y pH. Allí hemos

visto que después de una hora a 70° la actividad del sistema se había reducido al 42'8% de la original, motivada en parte por la solubilización de la enzima. Aquí la incubación es sólo de diez minutos, pero puede ser suficiente para que la pequeña dosis liberada de ureasa, haga aparecer la temperatura de 70°, como la óptima para la mayor actividad de la enzima inmovilizada.

De cualquier forma, un hecho si parece evidente, y es que hay una mayor uniformidad en las actividades para el intervalo de temperaturas estudiadas hasta el punto de que la diferencia en actividad entre los 60° y 30°, que en la ureasa soluble ya hemos visto, era del 52%, aquí sólo es del 14%. Esto también representa una ventaja con vistas a su posible empleo "in vivo".

La estabilidad del sistema a la conservación se puede considerar dentro de lo que parece ser normal para otros sistemas, ya que pasados 30 días mantiene una actividad equivalente al 55% de la inicial, si la conservación es a temperatura ambiente y liofilizado, ó del 60% si es en nevera a 4°. Cuando la conservación es con el sistema de suspensión en buffer de pH 6'7, las actividades residuales son del 46'8% a temperatura ambiente y del 56'3% en nevera.

Muy positivo puede considerarse también, el dato de la estabilidad de la ureasa inmovilizada tras pasos sucesivos sobre sustratos diferentes que en nuestro caso fueron siete, y si tenemos en cuenta las dificultades técnicas para reutilizar, sin pérdida aparente, el sistema HGMU dichas siete veces, el detectar un 70% de la actividad inicial es demostrativo de su alta estabilidad.

La resistencia a la temperatura del sistema HGMU es también manifiesta, permaneciendo prácticamente constante la actividad cuando

se dispone durante setenta minutos a temperaturas entre 30° y 60°C. A 70°C, sin embargo, pierde casi el 57% de la actividad inicial, posiblemente por la acción conjunta de una solubilización parcial y los conocidos cambios conformacionales de las enzimas que afectan a la actividad.

Como ya se ha hecho mención anteriormente, la solubilización parcial puede seguirse por los espectros de adsorción de los sobrenadantes, además de por la actividad enzimática de los mismos.

Cabe pues pensar que en este caso, si a los 70° se hubiese producido algún cambio conformacional, la enzima tiene capacidad de recuperación al descender la temperatura.

El valor de la constante de Michaelis-Menten, se aparta en nuestro sistema del comportamiento general, al aparecer algo inferior que el encontrado para la ureasa soluble, aproximadamente la mitad, 5.3×10^{-3} M para la ureasa en solución y 2.11×10^{-3} M para HGMU, ambas a las condiciones de trabajo, pH 6.7, y temperatura de 37°C. May y Li [12] trabajando también con ureasa, pero inmovilizada sobre un sistema de membrana líquida a base de tensioactivos, a pH 6.7 y 25°C, obtiene unos valores de 3.4×10^{-3} M para la soluble y 0.18 M para la inmovilizada, es decir, siempre mayor para la inmovilizada que para la soluble. Estas diferencias mayores ó menores, se interpretan como efectos de una difusión restringida del sustrato hacia la enzima inmovilizada, por cuyo motivo, la concentración actual del sustrato que la enzima es capaz de percibir, es menor que la concentración estequiométrica real del sustrato.

Si se acepta esta explicación, tendremos que concluir que para el sistema HGMU, no debe existir ninguna restricción del sustrato

para ponerse en contacto con la enzima y, en todo caso, lo que sí podría estar ocurriendo es el fenómeno contrario, el de un mayor aporte de sustrato a la vecindad de la enzima inmovilizada.

Efectivamente, parece existir la evidencia de que el sustrato no se encuentra con ninguna barrera difusional que vencer, ya que al haberse enlazado con el soporte HGM a través de las lectinas del extracto de mirto, su localización es superficial, y precisamente en la superficie externa del hematíe fijado con glutaraldehído.

En la parte experimental se han reseñado los resultados obtenidos cuando se siguen microscópicamente los procesos de inmovilización, mediante tinciones con Giemsa, Papanicolau, Sudán, Gram, en los cuales se apunta la evidencia de un enlace superficial como antes se señalaba.

El comportamiento del sistema HGMU frente al inhibidor metálico, Cu^{2+} , es también coherente con lo anteriormente expuesto, ya que concentraciones crecientes de Cu^{2+} , hacen disminuir más fuertemente la actividad de la ureasa inmovilizada que la de la soluble; también aquí parece que nos encontramos ante un proceso que facilita un mayor aporte del inhibidor a las inmediaciones de la enzima. Este hecho se produce tanto cuando el Cu está presente en la incubación como cuando el inhibidor ha estado en contacto durante cinco horas con el sistema HGMU. Esta mayor afinidad aparente por parte de los inhibidores podría explicarse simplemente por el mecanismo de difusión iónica a través de la membrana del hematíe, que al tratar de igualar concentraciones se podrían estar verificando una retención del inhibidor en la vecindad de la enzima, lo que obligaría a un nuevo aporte del inhibidor hacia el interior para conseguir dicha igualación de concentración.

La medida de la constante de Michaelis-Menten apunta también en este sentido ya que siendo menor la correspondiente al sistema HGMU que la de la ureasa soluble, y teniendo en cuenta el significado de la misma parece evidente que no existe ningún tipo de restricción difusional para el sustrato sino más bien al contrario, y como en el caso de los inhibidores, la formación de la asociación enzima-sustrato obligaría por el proceso difusional a un aporte suplementario del sustrato, en nuestro caso la urea, para igualar en concentración en el interior del hematíe a la del medio sustrato que le rodea. Se podría pues hablar de una mayor afinidad del sistema HGMU para la urea que la que tiene la ureasa soluble.

La enzima α -amilasa también es susceptible de inmovilización siguiendo la técnica preestablecida para la ureasa, aunque en este caso la influencia del pH en el proceso de fijación es bastante manifiesta ya que a pH 5 la inmovilización es máxima, resultando nula a pH 7 y superiores.

La pérdida de actividad por el proceso de inmovilización, va a guardar un cierto parecido con el sistema HGMU y con otros enzimas y soportes. En este sistema también nos encontramos con la dificultad para precisar la cantidad de enzima que se ha unido al sistema HGM.

Las medidas realizadas nos muestran que hay una pérdida del orden de un 65% y que también podríamos achacar a un proceso de solubilización de las moléculas débilmente unidas al realizarse los distintos lavados; no parece que haya cambio apreciable al someter al sistema al proceso de liofilización.

El estudio del sistema HGMA nos ha demostrado que no se varía con la inmovilización el pH óptimo de máxima actividad que se mantiene, como en solución, a pH 6, aunque si parece observarse una tendencia a conservar mayor actividad al aumentar el pH del sustrato de tal forma que, a pH 8, la α amilasa en solución disminuye en un 95% la actividad que le correspondía a pH 6, mientras que, en las mismas circunstancias, el sistema HGMA sólo disminuye su actividad en un 61%.

Esta mayor estabilidad se manifiesta en los ensayos de incubaciones previas de los sistemas inmovilizados y soluble a temperaturas diferentes, como lo demuestra el hecho de que en la prueba a 30°C, la pérdida de actividad para la soluble alcanza la cifra de 86'7%, mientras que el sistema HGMA disminuye en sólo el 30'4%. A 70°C sin em-

bargo, las pérdidas son semejantes, achacables en este caso a dos posibles fenómenos, redisolución de la α -amilasa inmovilizada y desactivación de la misma por desnaturalización térmica.

Los estudios para conocer las modificaciones de la actividad del sistema por la conservación vienen a demostrarnos que las mejores condiciones son las de mantenerlo en solución de CaCl_2 0'025 M a baja temperatura (4°), ya que en este caso la pérdida de actividad al cabo de veintiun días era sólo del 18'9%. Si la conservación es a temperatura ambiente (20-25), la pérdida de actividad era ya del 90%.

En ausencia de CaCl_2 en el medio de suspensión de pH 5'7, las pérdidas de actividad fueron respectivamente 36'7% y 91'7%.

El sistema HGMA desecado por liofilización presentaría ventajas para conservación a temperatura ambiente, en relación con los sistemas anteriores ya que las pérdidas de actividad en similares condiciones de baja temperatura (4°C) y temperatura ambiente fueron respectivamente 65'4% y 64'7%.

De las pruebas para conocer las actividades residuales del sistema HGMA a la acción de sustratos diferentes se demostraría lo ya conocido respecto a la necesidad de la presencia del ion calcio para la actividad enzimática de la α -amilasa, condición que parece persistir en la inmovilización. Aún cuando hay descritas α -amilasas que no precisan de la presencia del ion Ca , este no parece ser nuestro caso, ya que el mismo sistema HGMA frente a sustratos sin el CaCl_2 y con 0'025 M de este último, mostraban diferencias aparentes en la actividad respectivamente. La conservación de aproximadamente un 33% de la actividad inicial después de seis pases sucesivos de sustrato con CaCl_2 ,

la consideramos satisfactoria, e incluso que podría mejorarse actuando sobre los parámetros que puedan influir en esta actividad, como son temperatura, pH, concentración de Ca⁺⁺, etc.

La determinación de la afinidad hacia el almidón se hizo por un método similar al seguido para la obtención de la constante de Michaelis-Menten al presentar este la dificultad de que, no siendo el sustrato una especie química de peso molecular fijo, el dato numérico se ha obtenido representando gráficamente los inversos de las concentraciones expresados en mg de almidón/100 ml. De cualquier forma, los valores obtenidos para la α -amilasa en solución ó formando parte del sistema inmovilizado HGMA 0'317 y 0'183 respectivamente, son indicativos de un comportamiento en cierto modo parecido al del sistema HGMU, es decir de una mayor afinidad aparente del sistema inmovilizado para el sustrato. En este caso, aún cuando no debe existir ninguna restricción difusional del sustrato hacia la enzima inmovilizada, que la suponemos totalmente localizada en la superficie externa del hematíe (HGM) la mayor concentración del sustrato en los centros activos de la enzima podría explicarse por una gran eficiencia en la formación del complejo enzima-sustrato con el consiguiente mayor aporte difusional del sustrato desde el seno de la solución a la inmediata vecindad de la enzima, y que, por su tamaño molecular encontrará dificultades para atravesar la cubierta del hematíe transformado, que está haciendo de soporte para la α -amilasa, y pasar al interior.

Las menores diferencias encontradas para las constantes de Michaelis-Menten de los pares respectivos, amilasa soluble-HGMA y ureasa soluble-HGMU, podrían ser debidas más a la diferente naturaleza de los sustratos, almidón y urea, muy especialmente a su tamaño molecular, que a una diferencia de comportamiento de los sistemas HGMA y HGMU, para los que se vislumbra un mismo mecanismo de enlace enzima-soporte

por intermedio de la lectina, mecanismo que pudiera ser general para toda la sustancias proteicas, glicoproteicas ó lipoproteicas, con afinidades distintas de acuerdo con sus respectivos grupos receptores. Esto debe de ser motivo de estudio para su comprobación.

Con los ensayos efectuados con la pepsina hemos venido a demostrar que la inmovilización de la misma por intermedio del extracto de myrtus es posible, ya que existe interacción con formación de un precipitado, que conserva una actividad enzimática bastante manifiesta, es decir, que la insolubilización no inactiva a la enzima.

La dificultad se presenta a la hora de utilizar el soporte HGM que se degrada por la propia enzima que se inmoviliza.

De cualquier forma, se ha podido comprobar que el simple sistema PM puede considerarse, en principio, como un sistema inmovilizado, con todas las características de los mismos, ligeramente menos estable que los sistemas HGMU y HGMA, y que en su comparación con la pepsina en solución se podría destacar su, al parecer, mayor termoestabilidad. Es evidente que se hace preciso el continuar la búsqueda de nuevos sopores para la fijación de las lectinas del Myrtus que no se vean afectados por las enzimas proteolíticas.

423

C O N C L U S I O N E S

1) La lectina del *Myrtus Communis* es capaz de interaccionar con enzimas en solución, bien formando precipitados (pepsina) ó uniéndose al sistema HGM (α -amilasa, ureasa).

2) El estudio del efecto que tiene sobre el sistema HGM la acción de soluciones de diferente pH y distintas temperaturas nos ha mostrado la viabilidad de dicho sistema como soporte válido para la inmovilización de enzimas no proteolíticos.

3) La inmovilización de las enzimas α -amilasa y ureasa al sistema HGM es un proceso pH dependiente, observándose un máximo de inmovilización de la primera a un pH 5 y de la segunda a un pH 6.

4) Las enzimas inmovilizadas en el sistema HGM ó formando un precipitado conservan, aunque decrecida, su acción biocatalizadora.

5) El proceso de inmovilización de las enzimas lleva consigo los efectos siguientes en relación actividad-pH del sustrato.

a) Para el sistema HGMU salto de la actividad máxima a pH 7 frente a pH 9 de la ureasa en solución.

b) Para el sistema HGMA, no hay cambios para el pH de máxima actividad 5'7, pero sí menores descensos de actividad entre los pH 5 y 8.

c) En el sistema PM no hay cambio en el pH de máxima actividad pero en este caso, el sistema PM muestran mayores descensos en la actividad respecto a la peptina en solución, a medida que se aumenta el pH desde 2, que es el de máxima actividad.

6) Los cambios que se producen en la relación actividad-temperatura de incubación como consecuencia de la inmovilización, apuntan una mayor termoestabilidad con valores de actividad más uniformes para el intervalo de temperatura estudiado.

7) La liofilización de los sistemas inmovilizados y sus almacenamientos a baja temperatura, son condiciones que favorecen la estabilidad de los enzimas, como lo demuestran las actividades residuales después de treinta días en dichas condiciones: Sistema HGMU 56'4% del inicial, sistema HGMA en presencia de CaCl_2 0'05 M 81'1% (a los veintidos días).

8) La respuesta a las acciones sucesivas de los correspondientes sustratos, en los tres sistemas, resulta ser más ó menos parecida ya que en todas la actividad va decreciendo según va pasando el sustrato. El sistema más estable al paso de sustratos era el sistema HGMU. La adición de CaCl_2 a la solución sustrato del sistema HGMA influye muy positivamente en la estabilidad de éste.

9) Se ha demostrado una mayor afinidad aparente de los respectivos sustratos por las enzimas inmovilizadas según se desprende de las representaciones gráficas de Lineweaver-Burk, lo que apunta por una localización superficial de las enzimas sobre el soporte, sin ningún tipo de restricción difusional.

10) El soporte no puede ser utilizado para la inmovilización de enzimas proteolíticas del tipo de la pepsina, ya que se produce una auto-digestión de dicho soporte.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Pitcher, W.H.
J. Catal. Rev. Sci. 12: 36-69. 1975
- 2.- Korus, R.A., K.F., O'Driscoll.
Biotechnol. Bioeng. 17: 441-444. 1975
- 3.- Usami, S. y H. Shirasaki.
Hakko Koyko Zashi. 48: 506. 1970.
- 4.- Vorobeve, E.S. y O.M. Paltorak.
Vestn. Mask. Univ. 11 Knm. 21: 17. 1966
- 5.- Ogino, S.
Agr. Biol. Chem. 34: 1268. 1970.
- 6.- Usami, S., T. Yamada y A. Kimura.
Hakko Kyokaishi 25: 513. 1967
- 7.- Usami, S., Noda, J. y K. Goto.
Hakko Kogaku Zaishi. 49: 598. 1971
- 8.- Tossa, T., T. Mori e I. Chibata.
Enzimología 40: 49. 1971.
- 9.- Tossa, T., T. Mori e I. Chibata.
Agr. Biol. Chem. (Tokyo). 33: 1053. 1969
- 10.- Tossa, T., T. Mori, N. Fuse e I. Chibata.
Biotechnol. Bioeng. 9: 603-615. 1967
- 11.- Tossa, T., T. Mori e I. Chibata.
Agr. Biol. Chem. 33: 1053-1059. 1969

- 12.- Schnyder, B.J.
Die Starke. 26: 409-412. 1974
- 13.- Chen, J.F. y G.T. Tsao.
Enzymes in Food and Beverage Processing. Robert L.O. and Allen,
J.St.A. Editores. ACS Symposium 47: 104. 1977
- 14.- Park, P.K. y M. Toma.
J. Food Sci. 40: 1112-1114. 1975
- 15.- Stanley, W.L., G.G. Watters., S.H. Kelly., Chan, B.G., J.A.
Garibaldi y J.E. Schade.
Biotechnol. Bioeng. 18: 439-443. 1976
- 16.- Stanley, W.L., G.G. Watters, S.H. Kelly y A.C. Olson.
Enzymes in Food and Beverage Processing. Robert L.O. and Allen,
J.St.A. Editores. ACS Symposium 47: 104. 1977
- 17.- Stanley, W.L., G.G. Watters., B.Chon y J.M. Mercer.
Biotechnol. Bioeng. 17: 315-326. 1975
- 18.- Weetall, H.H.
Food, Product development. 3: 46-52. 1973
- 19.- Weetall, H.H. y M.B. Havewola.
Biotechnol. Bioeng. Symp. 241-266. 1972
- 20.- Zaborsky, O.A.
"Immobilized Enzymes".
CRC Press Cleveland, Ohio. 175. 1973
- 21.- Messing, R.A.
Process Biochemistry. 9: 26-28. 1974
- 22.- Wasserman, B.P., H.O. Hultin y B.S. Jacobson.
Biotechnol. Bioeng. 4: 320-321. 1980
- 23.- Emery, A.M., J.F. Kennedy y L.P. Devel-Chian.
J. Appl. Chem. Biotechnol. 28(11): 775-83. 1978

- 24.- Brotherton, J.E., A. Emery y V.W. Rodwell.
Biotechnol. Bioeng. 18: 527-543. 1976
- 25.- Byrne, M.J. y D.B. Johnson.
Biochem. Soc. Trans. 2: 496-497. 1974
- 26.- Weetall, H.H. y Hersh, L.S.
Biochem. Biophys. Acta. 1970. 206: 54-60. 1970
- 27.- Hering, W.M., R.L. Laurence y J.R. Kitrell.
Biotechnol. Bioeng. 14: 975-984. 1972
- 28.- Markey, P.E., P.F. Greenfield y J.R. Kitrell.
Biotechnol. Bioeng. 17: 285-289. 1975
- 29.- Messing, R.A. y A.M. Filbert.
J. Agr. Food. Chem. 23: 920-923. 1975
- 30.- Yamamoto, H. y S. Harie.
Jpn. Kokay Tokyo Koho. 78: 130, 487. 1979
- 31.- S. Zuzuki e I. Karube.
Prep. Eur. Cong. Biotechnol. Ist. 1978
- 32.- Vieth, W.R.
"Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes".
A.C. Olson y C.L. Cooney editores. 157-185. Plenum Press. 1974
- 33.- Barndt, R.L., S.S. Wang y J.G. Leeder.
J. Food Sci. 41: 494-497. 1976
- 34.- Okos, M.R.
Disertación Universidad del Estado de Ohio. 1975
- 35.- Olson, A.C. y W.L. Stanley.
J. Agr. Food. Chem. 21: 440-445. 1973
- 36.- Boundy, J.A., K.L. Smiley., C.L. Swanson.
Enzymes in Food and Beverage Processing. Robert L.O. and Allen,
J.St.A. Editores. ACS Symposium. 47: 104. 1977

- 37.- Kimura, K., Y. Yokote y M. Fujita.
Enzyme Eng. 3: 531-536. 1978
- 38.- Samejima, H. y K. Kimera.
"Enzyme Engineering". Volúmen 2. E.K. Pye y L.B. Wingard editores.
131-135. Plenum Press. 1974
- 39.- O'Driscoll, K.F.
Enzymes in Food and Beverage Processing. Robert L.O. and Allen,
J.St.A. Editores. ACS Symposium 47: 109. 1977
- 40.- Vasta, B. y V. Osdin.
Melpar. Inc. Folls. Church.
Vn. Final Repart Conctract. No D.A. 18: 108-405. CML 828. Section.
3, 3, 4. p 3. 102. Oct. 1963
- 41.- Bernfeld, P. y J. Wan.
Science 142: 678-679. 1973
- 42.- Barabino, R.C., D.N. Gray y M.H. Keyes.
Clin. Chem. 24 (8): 1393-8. 1978
- 43.- Waterland, L.R., A.S. Michaels y C.R. Robertson.
Amer. Inst. Chem. Eng. Journal. 20: 50-9. 1974
- 44.- Korus, R.A. y A.C. Olson.
Enzymes in Food and Beverage Processing. Robert, L.O. and Allen,
J.St.A. Editores. ACS Symposium. 47: 110. 1977
- 45.- Korus, R.A. y A.C. Olson.
Biotechnol. Bioeng. 50: 625-632. 1972
- 46.- Ked, K. y K. Takizawa.
Tatashi Electronics Co. Ltd.
Tokay Tokyo Koho. 80: 37-135. Marzo. 1980
- 47.- Sundaram, P.V.
Hind. Antibiot. Bull. 20 (1-2): 1-4. 1977

- 48.- Ihler. G.M., R.H. Glew y F.W. Schnure.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 70: 2663. 1973.
- 49.- Baker. R.F.
Nature. 215: 424-425. 1967
- 50.- Hoffman, J.F.
J. Gen. Physiol. 42: 9-28. 1958
- 51.- Narsden, N.V.B. y S.G. Ostling.
Nature 184: 723-724. 1959
- 52.- Seeman, P.
J. Cell Biol. 32: 55-70. 1967.
- 53.- Levin, F.B., L.A. Sorokina.
Dokl. Akad. Nauk. SSSR. 249 (1): 235-7. 1979.
- 54.- Rifkind, R.A.
Amer. J. Med. 41: 711-722. 1966.
- 55.- Whitaker, T.R., G.R. Sartiano., L.J. Hamelly., W.L. Scott y R.H. Glew.
J. Lab. Clin. Med. 84: 879. 1974
- 56.- Penchev, P., R. Brady., S. Hiffert., A. Gal y D. Shapiro.
J. Biol. Chem. 248: 5256-5261. 1973
- 57.- Brady, R., P. Penchev., A. Gal., S. Hibert y A. Dekabon.
New Engl. J. Med. 291: 981-993. 1974.
- 58.- Richardson, T.
Wisconsin, Alumnin Research. Foundation. 472-588. Marzo, 1979.
- 59.- Cuatrecasas, P. y C.B. Anfinsen.
Annu. Rev. Biochem. 40: 259. 1971
- 60.- Cuatrecasas, P. y C.B. Anfinsen.
Methods Enzymol. 22: 345. 1971.

- 61.- Lowe, C.R. y P.D.G. Dean.
Affinity Chromatography.
(John Wiley y Sans Ltd. London). 1974
- 62.- Cuatrecasas, P. y M. Wilchek.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 33: 325. 1968
- 63.- Cuatrecasas, P.
J. Biol. Chem. 245: 574. 1970.
- 64.- Cuatrecasas, P.
J. Biol. Chem. 245: 3059. 1970
- 65.- Lowe, C.R.
Eur. J. Biochem. 73: 265. 1977
- 66.- O'Carra, P., S. Barry y T. Griffin.
Biochem. Soc. Trans. 1, 289. 1973
- 67.- O'Carra, P., S. Barry y T. Griffin.
Methods Enzymol. 34: 108. 1974
- 68.- Holroyde, M.J., J.M.E. Chesher, I.P. Trayer y D. G. Walker.
Biochem. J. 153: 351. 1976
- 69.- Nishikawa, A.H., P. Bailori y A.H. Ramel.
J. Macromol. Sci. Chem. A₁₀ 1999. 1976.
- 70.- Harvey, M.J., C.R. Lowe y P.D.G. Dean.
Eur. J. Biochem. 41: 353. 1974
- 71.- Yon, R.J.
Biochem. J. 126: 765. 1972.
- 72.- Er-El. Z., Y. Zaigenzaig y S. Shaltriel.
Biochem. Biophys. Res. Commu. 49: 383. 1972
- 73.- Hofstee, B.H.J.
Biochem. Biophys. Res. Commu. 50: 751. 1973

- 74.- Porath, J., L. Sundberg., Fordnstedt e I. Olsson.
Nature. 245: 465. 1973
- 75.- Hjerten, S., J. Rosengren y S. Pahlman.
J. Chromatogr. 101: 281. 1974
- 76.- Laast, T.
J. Chromatogr. 111: 373. 1975
- 77.- Porath, J., T. Laast y J. C. Janson.
J. Chromatogr. 103: 49. 1975
- 78.- Dahlgren, C.K., R. Axen, y J. Porath
Biothechnol. Bioeng. 17: 617. 1975
- 79.- Brucklehust, K., J. Carlsson., M.P.J. Kierston y E. M. Crook.
Biochem. J. 133: 573. 133. 1973
- 80.- Carlsson, J., R. Axen., K. Brocklehust y E.M. Crook.
Eur. J. Biochem. 44: 189. 1974
- 81.- Carlsson. J., R. Axen., K. Brocklehust y E.M. Crook.
Eur. J. Biochem. 59: 567. 1975
- 82.- Axen, R., H. Drevin y J. Carlsson.
Acta. Chem. Scand. Ser. B. 29: 471. 1975
- 83.- Porath, J., J. Carlsson, I. Olsson y G. Belfrage.
Nature. 258: 589. 1975
- 84.- Bowod. A., P. Byron., J.B. Hudson y J.H. Turnbull.
Photochem. Photobio. 11: 445. 1970.
- 85.- Slikin, M.A.
Charge Transfer. Interactions of Biomolecules. Academic Press.
234-241. 1971
- 86.- Agrawal, B.B. y I.J. Goldstein.
Biochem. J. 96: 236. 1965

- 87.- Aspberg, K., H. Halmen y J. Porath.
Biochem. Biophys. Acta. 310: 496. 1973
- 88.- Porath, J. y R. Axen.
Methods in Enzymology. 1976
- 89.- Ersson, B. y colaboradores.
Biotechnological Applications of Proteins and Enzymes.
Bohak, Z. y Sharon N. Editores. Academic Press. 95. 1977
- 90.- Ersson, B., K. Aspberg y J. Porath.
Biochem. Biophys. Acta. 310: 446. 1973
- 91.- Porath, J. y L. Sundberg.
The Chemistry of Biosurfaces.
M.L. Hair Editores. Vol. 3. 653. Dekker. 1972
- 92.- Aspberg, K. y J. Porath.
Acta Chem. Scand. 24: 1839. 1970
- 93.- Brattain, M.G., P.M. Kimball y T.G. Prettlow.
A. Biochem. J. 163: 247-251. 1977
- 94.- Vant Etten, R.L. y M.S. Saini.
Biochem. Biophys. Acta. 484: 487-492. 1977
- 95.- Ortega, M. y A. Dolara.
Anales Inst. Bot. A. Cavanilles. 237. 1966
- 96.- Gago, F. Tesina. Fac. Farmacia. Madrid-Complutense. Noviembre.
1979
- 97.- Sainz, C. Tesis Doctoral. Fac. Farmacia. Madrid-Complutense.
Mayo. 1980
- 98.- Abeger, A. Tesis Doctoral. Fac. Farmacia. Madrid-Complutense.
Marzo. 1974
- 99.- Ortega, M. y A. Abeger.
Ciencia & Industria Farmacéutica. Nº 4. 103-111. 1976

- 100.- Ródenas, S. Tesis Doctoral. Fac. Farmacia. Madrid-Complutense.
Junio. 1978
- 101.- Andrés, P. Tesina. Fac. Farmacia. Madrid-Complutense. Julio.
1977
- 102.- Ortega, M., y S. Ródenas.
Clin. Chem. Acta. 92: 135. 1979
- 103.- Ortega, M. y R.M. Otero.
Unifarma. V. 224. 1975
- 104.- Chang, T.M.S.
Science 146: 524. 1964
- 105.- Chang, T.M.S.
Ph. D. Thesis. Mc.Cill. University. 1965
- 106.- Chang, T.M.S.
Artificial Cells. 1972
- 107.- Chang, T.M.S. y F.C. Mc Intosh.
Pharmacologist. 6: 198. 1964
- 108.- Chang, T.M.S.
Trans. Amer. Soc. Artificial. Internal. Organs. 12: 13. 1966
- 109.- Chang, T.M.S., L.J. Johnson y O. Ransome.
Con. J. Physiol. Pharmaceutical. 45: 705. 1967
- 110.- Chang, T.M.S.
Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins.
T.M.S. Chang. Editor. Plenum Press. VL. 1977 284
- 111.- Chang, T.M.S. y T. Lou.
The Physiologist. 13: 70. 1970.
- 112.- Chang, T.M.S. y M.J. Pornansky.
Nature 218: 243. 1968

- 113.- Gardner, D.L., R.D. Falb., B.C. Kin y D.C. Emmerling.
Trans. Amer. Soc. Artificial. Internal. Organs. 17: 239. 1971
- 114.- Chang, T.M.S.
Trans. Amer. Soc. Artificial. Organs. 1966
- 115.- Guilbault, G.G. y J. Montalvo.
Enzymatic Methods of Analysis. Guilbault, G.G. Pergamon Press.
256. 1970
- 116.- Guilbault, G.G.
Enzymatic Methods of Analysis. Pergamon Press. 200. 1973
- 117.- Mosbach, K., B. Danielsson., H. Borgeraud., A. y M. Scott.
Biochem. Biophys. Acta. 403: 256-265. 1975
- 118.- Mattiasson, B., B. Danielsson y K. Mosbach.
Anal. Lett. 9: 217. 1976
- 119.- Danielsson, B., K. Godd., B. Mathiasson y K. Mosbach.
Anal. Lett. 9: 987. 1976
- 120.- Barker, S.A., P.J. Somers., R. Epton y J.V. Mc Loren.
Carbohydr. Res. 14: 286-296. 1976
- 121.- Strumeyer, D.H., A. Constantinides y J.J. Freudenberger.
Food. Sci. 39: 498-502. 1974
- 122.- Ledingham, W.N. y W.E. Hornby.
FEBS Lett. 5: 118. 1969
- 123.- Fawcett, J.K. y J.E. Scott.
J. Clin. Path. 13: 156. 1960
- 124.- Smith y Roe.
Química clínica moderna.
Tieztz N.W. Editorial Interamericana 425. 1970
- 125.- Hunl.
Harold Varley, M.
Métodos de análisis clínicos y su interpretación bioquímica.
Editorial Tecnos. 267-268. 1961

- 126.- Lowry, O.H., M.S. Rosebrouh., A.L. Farr., R.J. Randell.
J. Biol. Chem. 193. Nº 1. 1951
- 127.- Pornansky, M.J.
Biochemical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins.
Ed. T.M.S. Chang Plenum Press. New York. Tomo II. P. 345. 1977
- 128.- Thorpe, S.R., M.B. Fiddler y R.J. Desnick.
"Enzyme therapy V: in vivo fate of B-glucuronidase in B-glucuronidase deficient mice". Pediat. Reg. 9: 198. 1975
- 129.- May, S.W. y N.N. Li.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47: 1179-85. 1972

